

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Química

Aplicación de residuos vegetales en el tratamiento de aguas contaminadas por metales



Facultad de Ciencias
Universidad de Cádiz
2017/2018

Alumna: Lorena Sánchez Ponce

Tutoras: Dra. María Dolores Granado Castro

Dra. Margarita Isabel Díaz de Alba

En estas líneas me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado y apoyado durante todos estos años para poder llegar hasta este momento.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutoras Dra. Dña. María Dolores Granado Castro y Dra. Dña. Margarita Isabel Díaz de Alba por enseñarme lo que es de verdad el trabajo de investigación en el laboratorio. Por guiarme y ayudarme en todo momento, por transmitirme su entusiasmo por la ciencia y por aguantar mis muchas preguntas, resolviéndomelas siempre con una sonrisa. Gracias, porque sin vosotras este trabajo nunca hubiese sido posible.

También me gustaría agradecer a la profesora más trabajadora y comprometida con la ciencia, la universidad y la docencia que he conocido. Siempre con alguna biomasa nueva en mente con la que probar y con ideas para solucionar los muchos problemas que me han ido surgiendo a medida que avanzaba en la realización del trabajo. Una persona que transmite su gran entusiasmo por la ciencia a todos los que rodea y de la que se aprende mucho. Alguien a quien admirar y admiro, Dra. Dña. María Dolores Galindo Riaño. Gracias, sin ti tampoco hubiese sido posible.

Darle las gracias también a la profesora Dra. Dña. María José Casanueva Marengo y a los técnicos María Jesús, Clara, Jesús Gestoso y Carlos por haberme ayudado siempre que lo he necesitado. A mis compañeros de laboratorio Rubén, Gara, Marta, Jesús Lande, Adrián y Sonia por ayudarme y darme apoyo durante todo este tiempo. En especial a Marta por traerme de su campo muchas de las biomasas y acompañarme esos días en los que llegábamos a las 8 de la mañana y nos íbamos a las 9 de la noche. Agradecer también a los alumnos colaboradores Silvia, David, Paola y Sergio dispuestos a echarme una mano cada vez que podían.

Agradecer también a los amigos que me han acompañado casi desde el primer día que entré en la facultad: Carmen Mari, Juanma y Carlos. Y a los que fui conociendo más adelante: María, Marta B., Marta C., Mamen, Isa y Pablo. Gracias a vosotros estos años han estado cargados de risas y buenos momentos. Siempre dándome ánimos con el trabajo y visitándome en mis largas horas pegadas al tamiz.

En último lugar, pero más importante de todo, me gustaría agradecerse a todos los miembros de mi familia, sin los cuales nunca hubiese llegado hasta aquí. A mis padres por aguantar mis agobios y apoyarme cuando el día había ido mal, animándome siempre. Por interesarse en lo que hacía en el laboratorio, aunque les sonase un poco a chino. Y a mi hermanita por esos momentos en los que te llevaba al entrenamiento, después de un largo día en la facultad y te veía disfrutar de ese deporte que adoras llamado baloncesto, permitiéndome desconectar de todo lo relacionado con la universidad.

Gracias a todos por lo que me habéis aportado durante este duro camino.

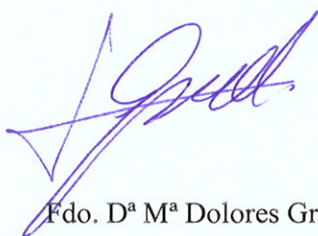
Memoria presentada por Lorena Sánchez Ponce, para optar al título de Grado en Química, de la Universidad de Cádiz.



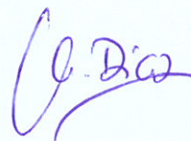
Fdo: Lorena Sánchez Ponce

Puerto Real, a 18 de septiembre de 2018

El presente trabajo ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz, dentro del Grupo de Investigación Geoquímica Marina, bajo la tutorización conjunta de las Profesoras D^a M^a Dolores Granado Castro y D^a Margarita Isabel Díaz de Alba, reuniendo las condiciones exigidas para optar a la defensa y evaluación del Trabajo de Fin de Grado para el título de Grado en Química, y así lo hacen constatar:



Fdo. D^a M^a Dolores Granado Castro



Fdo. D^a Margarita Isabel Díaz de Alba

Puerto Real, a 18 de septiembre de 2018

ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Origen de la contaminación del medio acuático por metales pesados	3
3.2. Metales estudiados	4
3.3. Maneras de hacer frente al problema de la contaminación del agua por metales pesados	5
3.4. Factores que influyen en la capacidad de biosorción metálica	6
3.4.1. La naturaleza del biosorbente	6
3.4.2. La temperatura	8
3.4.3. Valor del pH de la fase acuosa a descontaminar	8
3.4.4. La presencia de otros iones competidores y contra-iones	8
3.4.5. Efecto de la cantidad de biosorbente	9
3.4.6. El tamaño de partícula	9
3.5. Aplicaciones de biosorbentes inertes para la retención de metales pesados	9
4. OBJETIVOS	11
5. MATERIAL, MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
5.1. Material y Métodos	12
5.1.1. Materiales, reactivos y equipos	12
5.1.2. Método de limpieza del material	13
5.1.3. Tratamientos previos realizados a las distintas biomasas	13
5.1.4. Preparación de las disoluciones reguladoras	15
5.1.5. Preparación de las disoluciones de metal (Disolución A)	15
5.1.6. Preparación de la disolución de control (Disolución B)	16
5.1.7. Ensayos para determinar la capacidad biosorbente de las biomasas seleccionadas	16
5.1.8. Determinación de la concentración de metal mediante espectroscopía de absorción atómica con llama	19
5.1.9. Determinación de la concentración de metal mediante espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo ICP-OES	20
5.1.10. Optimización de la metodología propuesta: Diseño de experimento 2 ³	21
5.1.11. Caracterización de la biomasa seleccionada	22

5.1.11.1. Determinación de la densidad aparente de la biomasa.....	22
5.1.11.2. Determinación de la capacidad de adsorción de yodo de la biomasa	22
5.1.11.3. Determinación de la carga superficial negativa de la biomasa	23
5.2. Resultados y Discusión	25
5.2.1. Comparación de los porcentajes de biosorción de metales para las diferentes biomazas	25
5.2.2. Optimización de la metodología propuesta: Diseño de experimento 2 ³	27
5.2.3. Características analíticas del método de biosorción de Cr(VI)	33
5.2.3.1. Estudio del rango lineal del método	33
5.2.3.2. Cálculo del límite de detección (LD) y cuantificación (LC).....	34
5.2.3.3. Estudio de la reproducibilidad del método	35
5.2.4. Caracterización de la biomasa de semilla de uva palomino fino	36
5.2.4.1. Determinación de la densidad aparente de la semilla de uva palomino fino	36
5.2.4.2. Determinación de la capacidad de adsorción de yodo de la semilla de uva palomino fino	36
5.2.4.3. Determinación de la carga superficial negativa de la semilla de uva palomino fino	37
6. CONCLUSIONES	40
7. BIBLIOGRAFIA.....	41

1. RESUMEN

Los altos niveles de contaminación que hay en la actualidad en los ecosistemas acuáticos están estrechamente relacionados con el aumento de la actividad industrial de las últimas décadas. Los contaminantes acceden a la cadena trófica por medio de plantas y animales acuáticos, los cuales sirven de alimento para los seres humanos, pudiendo llegar a provocar graves enfermedades. Algunos de los contaminantes más peligrosos son los metales pesados. Están presentes en la mayoría de aguas residuales de las industrias, aguas que al final pueden acabar llegando a las masas de agua. Es por esta razón que existe un gran interés en tratar dichos efluentes antes de que sean vertidos. Muchas de las técnicas de limpieza de aguas residuales que existen suelen conllevar costes elevados. De ahí que sea interesante buscar alternativas más económicas para tal fin, como puede ser el uso de biosorbentes naturales capaces de retirar los metales pesados del agua.

Así, el presente trabajo se centra en encontrar residuos vegetales que puedan ser utilizados para su aplicación en procesos de biosorción de metales presentes en aguas contaminadas. Las biomásas estudiadas son cáscara de naranja amarga verde (*Citrus aurantium*), kumquat (*Citrus japonica*) y semilla de uva palomino fino (*Vitis vinifera* 'Palomino'). Y los metales elegidos para su remediación en aguas son cadmio, plomo, cromo, cobalto y níquel, dada su alta toxicidad y/o persistencia en el medio.

El estudio se realiza poniendo en contacto directo las biomásas (tras someterlas a un secado y triturado previo) con los diferentes metales y agitándolos durante un periodo de tiempo. Durante los ensayos de biosorción se controla la concentración del metal que queda en la disolución mediante análisis por espectroscopía de absorción atómica con llama. De los resultados obtenidos se concluye que la semilla de uva palomino fino es la biomasa más efectiva, con un alto porcentaje de biosorción de Pb(II) y Cr(VI). Así, se continúan las investigaciones sobre la biosorción de Cr(VI), ya que es un metal muy interesante en la calidad de las aguas. Para ello se realiza un diseño de experimento 2^3 de las variables pH, tiempo y cantidad de biomasa que permite la optimización del proceso, obteniéndose un porcentaje de biosorción del 91,7% en las condiciones óptimas: pH 5,5; 8 horas; concentración de biomasa de 15 g/L. Tras la optimización de las variables se evalúan las características del método, evaluando el rango lineal de aplicación (0-2 mmol/L), precisión (0,64%), límite de detección (0,06 mg/L) y límite de cuantificación (0,19 mg/L).

Por último, se realiza un estudio para caracterizar algunas propiedades de la semilla de uva palomino fino, tales como la densidad aparente de la biomasa ($1,02 \pm 0,09$ g/mL), la capacidad de adsorción de yodo (1181 ± 10 mg I_2 / g biomasa) y la carga superficial negativa ($2,35 \pm 0,24$ mmol H^+ /g biomasa), que permiten compararla con otras biomásas ya caracterizadas en la bibliografía, y evidencian la utilidad de la biomasa procedente de uva palomino fino en su aplicación en el tratamiento de aguas contaminadas por metales.

2. ABSTRACT

The high levels of pollution that are currently in aquatic ecosystems are closely related to the increase in industrial activity in recent decades. Pollutants access the food chain through aquatic plants and animals which serve as food for humans and can cause serious diseases. The problem lies in the high prices of wastewater cleaning techniques which is the reason why we are looking for some kind of bioadsorbents capable of removing heavy metals from water. Some of the most dangerous pollutants are heavy metals. They are present in the majority of wastewater from industries, the waters of which eventually reach the sea and pollute the ecosystem. It is for this reason the interest to treat these effluents before they are discharged. The problem lies in the high prices of wastewater cleaning techniques which is the reason why we are looking for some kind of bioadsorbents capable of removing heavy metals from water.

For that, the present project focuses on finding plant residues that can be used for their application in processes of biosorption of metals present in contaminated water. The biomasses studied are green bitter orange peel (*Citrus aurantium*), kumquat (*Citrus japonica*) and fine palomino grape seed (*Vitis vinifera* 'Palomino'). And the metals chosen for water remediation are cadmium, lead, chromium, cobalt and nickel, given their high toxicity and/or persistence in the environment.

The study is carried out by directly contacting the biomasses (after subjecting them to a previous drying and crushing) with the different metals and stirring them for a period of time. During the biosorption tests, the concentration of the remaining metal in the solution is controlled by atomic absorption spectroscopy with flame analysis. From the results obtained, it is concluded that the fine palomino grape seed is the most effective biomass, with a high percentage of biosorption of Pb(II) and Cr(VI). Thus, the biosorption of Cr(VI) is studied, since it is a very interesting metal in the quality of the waters. For this, an experiment design 2³ of the variables pH, time and amount of biomass is made, obtaining a percentage of biosorption of 91.7% at the optimal conditions: pH 5.5; 8 hours; biomass concentration of 15 g/L. After optimizing the variables, the characteristics of the method are evaluated, obtaining the linear range of application (0-2 mmol/L), the precision (0.64%), the limit of detection (0.06 mg/L) and the limit of quantification (0.19 mg/L).

Finally, a study is carried out to characterize some properties of the fine palomino grape seed, such as the apparent density of the biomass (1.02 ± 0.09 g/mL), the iodine adsorption capacity (1181 ± 10 mg I₂/g biomass) and the negative surface charge (2.35 ± 0.24 mmol H⁺/g biomass), which make it possible to compare it with other biomasses already characterized in the literature, and show the usefulness of biomass from fine palomino grapes in its application in the treatment of water contaminated by metals.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. *Origen de la contaminación del medio acuático por metales pesados*

Hoy día, la gran mayoría de las enfermedades relacionadas con el medio ambiente son causadas por el incremento de la actividad industrial que se lleva viviendo a lo largo de las últimas décadas. Este crecimiento ha acarreado un gran aumento de los niveles de contaminación, lo cual provoca más muertes en el mundo que por ejemplo el tabaco, el hambre, los desastres naturales, las guerras o la malaria [Landrigan y col., 2017].

Uno de los grandes afectados por este aumento de la contaminación es el agua. El agua es uno de los recursos más importantes para el ser humano, de hecho, la vida a lo largo de su historia se ha desarrollado entorno al agua (ríos, lagos o mares). Sus usos van desde el cultivo hasta el uso en industrias, pasando por el consumo humano. Existen formas de eliminar los contaminantes del agua, pero la encarecerían tanto que pasaría a ser un artículo de lujo. Por eso existe una creciente preocupación por su cuidado y protección [Benson y col., 2017].

Los contaminantes del agua pueden ser físicos, biológicos o químicos. Algunos ejemplos de contaminantes físicos pueden ser la introducción de partículas radioactivas, la aparición de sólidos en suspensión o el aumento de la temperatura. Como contaminantes de origen biológico se encuentran las bacterias, virus y algas procedentes de aguas residuales, cuyos posibles efectos son la transmisión de enfermedades, como el tifus o el cólera, entre otras. Los contaminantes químicos pueden ser orgánicos como las aguas residuales urbanas, los pesticidas o los hidrocarburos, e inorgánicos como por ejemplo los metales pesados [Baken y col., 2018].

Debido a ciertas actividades humanas, como la agricultura, la minería o los procesos industriales, han llegado a ríos, lagos y aguas subterráneas grandes cantidades de metales pesados. Estos pueden ser muy perjudiciales para el medio ambiente y para los seres vivos debido a su alta toxicidad, su capacidad de bioacumulación y su persistencia en el medio [Zhang y col., 2018]. Aunque en grandes cantidades siempre son perjudiciales, muchos son esenciales para la vida como por ejemplo cobre, zinc, manganeso, níquel o hierro [Sarwar y col., 2017]. Además, en el medio acuático se pueden encontrar de forma natural procedentes principalmente de la erosión de minerales, pero en concentraciones muy bajas. La gran mayoría se encuentran en los sedimentos, pasando en condiciones normales solo una pequeña parte a la columna de agua [Qu y col., 2018a].

Esta situación puede sufrir modificaciones por cambios en las condiciones físico-químicas del agua, como son variaciones de temperatura, pH, o fuerza iónica, que lleven al aumento de los metales procedentes de los sedimentos hacia la columna de agua. Otro problema añadido se da cuando los metales pesados que se encuentran en el medio acuático, son absorbidos por la biota del entorno,

entrando así en la cadena trófica y aumentando los niveles de consumo diario máximos, causando graves enfermedades a los organismos [Kobielska y col., 2018].

3.2. Metales estudiados

Como se ha comentado, los metales se pueden dividir en dos grupos desde un punto de vista biológico: los esenciales para la vida como boro, cobalto, cobre, hierro, molibdeno, níquel y zinc, y los tóxicos a niveles traza como arsénico, cadmio, cromo, mercurio y plomo [Edelstein y Ben-Hur, 2018]. Aunque algunos metales sean esenciales para la vida, la sobreexposición a ellos resulta igualmente tóxica para los organismos. Los metales con mayor riesgo ambiental son $Cd > Pb > Hg > Cr > Co > Cu > Ni > Zn > Al > Fe$ [Volesky, 2001], de los cuales son estudiados en el presente trabajo Cd, Pb, Cr, Co y Ni.

El cadmio se puede encontrar en la naturaleza en menas de cobre, en forma de óxidos complejos y en forma de sulfuros y carbonatos presentes en las menas de zinc y plomo. Se obtiene industrialmente como subproducto en la producción de metales como plomo, cobre o zinc, y suele ser utilizado en la fabricación de baterías, plásticos, recubrimientos para metales y pigmentos [ATSDR, 1999]. Es considerado uno de los metales más peligrosos para la salud y el medio ambiente. Se relaciona con enfermedades como hipertensión, depresión, discapacidad auditiva, Alzheimer, cáncer de mama, cáncer de pulmón y enfermedades cardíacas [Satarug y col., 2017].

El cobalto se puede encontrar de forma natural en rocas y plantas. También se obtiene como residuo de procesos industriales como la combustión de carbón o petróleo, la fabricación de imanes o la fabricación de motores de aviones. En concentraciones pequeñas es esencial para los seres vivos debido a que forma parte de la vitamina B₁₂. Sin embargo, cuando un organismo está expuesto a una concentración muy elevada puede sufrir dificultades respiratorias, siendo incluso cancerígeno para los animales [Suh y col., 2016].

El cromo se puede encontrar como residuo en los procesos de cromado [Kaya y col., 2016] y en la industria textil. Se puede encontrar en su forma trivalente Cr(III), que es esencial para el mantenimiento de los metabolismos de lípidos, glucosa y proteínas [Lipko y Debski, 2018], o en su forma hexavalente Cr(VI), que produce disminución de los linfocitos del sistema inmunológico, problemas respiratorios, carcinogenicidad, mutagenicidad y teratología [Elhosary y col., 2014].

El níquel se encuentra de forma natural en los suelos, fondos marinos o minas, pero su concentración en el medio puede aumentar debido a diversas actividades antropogénicas como la incineración de basura, plantas de energía, la fabricación de motores o las industrias dedicadas a la fabricación de aleaciones de compuestos de níquel, entre otros. Este metal es esencial para las plantas

y el medio ambiente, pero la exposición a altas concentraciones produce dermatitis y carcinogénesis [Zambelli y col., 2016].

El plomo se puede encontrar en la naturaleza proveniente de la erosión de minas de plomo y de emanaciones volcánicas. También se puede encontrar en pinturas, polvo atmosférico, medicamentos, gasolina, alimentos, e incluso en el agua del grifo, debido a que durante mucho tiempo se ha utilizado en la fabricación de las tuberías que suministran el agua [Jarvis y col., 2018]. Este metal se relaciona con dolores abdominales severos como cólicos, convulsiones, encefalopatía y anemia [World Health Organización, 2010].

3.3. Maneras de hacer frente al problema de la contaminación del agua por metales pesados

Actualmente existe gran cantidad de procesos cuyo objetivo es la eliminación de metales pesados en aguas residuales, debido a la creciente preocupación por garantizar la no toxicidad del agua. Según la legislación vigente [BOE núm. 170, de 3 de junio de 2002], la concentración máxima permitida para el cadmio, cromo, níquel y plomo en los vertidos de aguas residuales industriales a los sistemas públicos de saneamiento es 0,5; 5; 5; y 1 mg/L, respectivamente.

Algunos de los procesos más utilizados son la absorción, la adsorción, el intercambio iónico, la formación de complejos superficiales, la precipitación y la filtración mediante membrana. Algunos ejemplos de estos procesos son la adsorción utilizando carbón activo sometido a un tratamiento oxidativo [Tao y col., 2015], la filtración asistida por complejos con goma de acacia [Manawi y col., 2018] o la flotación iónica [Taseidifar y col., 2017]. El problema de la mayoría de estos procesos es que conllevan elevados costes, debido a su complejidad o a la necesidad de modificar física o químicamente el sorbente. Este problema hace muy difícil que las pequeñas o medianas empresas puedan invertir en estos sistemas para descontaminar sus aguas residuales. A causa de ello, estas empresas optan por expulsar sus aguas contaminadas a ríos, lagos o mares.

Debido a esto, los estudios actuales se centran en la búsqueda de procesos que no necesiten tratamientos tan costosos, pero que sean igual de eficientes. Uno de estos procesos se conoce como biosorción, la cual consiste en la interacción de una superficie sólida de matriz biológica con un sorbato, provocando la reducción de la concentración de sorbato en una disolución [Fomina y Gadd, 2014]. En el proceso de biosorción los metales se unen a los centros activos que tienen los materiales biológicos mediante varios mecanismos que pueden ser: adsorción física, adsorción por intercambio iónico, quelación, formación de complejos, microprecipitación o absorción. Por lo tanto, el término biosorción se puede utilizar para referirse tanto a la adsorción como a la absorción. La diferencia entre ambas es que la adsorción se realiza en la superficie del material biológico produciendo una monocapa, mientras que en la absorción se produce una estructura tridimensional.

La forma tradicionalmente más común de biosorción que está presente en los procesos de biorremediación de aguas contaminadas por metales es la adsorción. Pero como según las condiciones puede producirse adsorción o absorción o ambas y en diferentes proporciones, lo más utilizado es el término biosorción. De este modo se puede utilizar este término para describir cualquier proceso que implique la interacción entre un sorbato y un biosorbente, dando lugar a una acumulación en la interfase sorbato-biosorbente.

Actualmente el interés en la investigación de biosorbentes se dirige a encontrar biomásas capaces de sorber metales, como pueden ser plantas [Alvarado y col., 2008], semillas o cáscaras de frutas [Mahindrakar y Rathod, 2018], que sean de bajo coste y que no necesiten modificaciones que encarezcan su precio, como ocurre con el carbón activo modificado obtenido a partir de materiales biológicos. De esta manera, lo que para una empresa de zumos se considera un residuo, puede servir para descontaminar aguas residuales. Así se minimizan costes, haciendo la descontaminación de aguas más accesible para las industrias. Estos procedimientos se encuadran dentro de las técnicas novedosas de biorremediación.

La biorremediación consiste en la utilización de microorganismos, hongos, plantas o derivados de ellas, para eliminar los contaminantes que se encuentran en el medio ambiente o transformarlos en menos tóxicos [González-Rojas, 2011]. Entre los residuos vegetales o biomásas con potencial para sorber metales pesados de las aguas contaminadas se pueden encontrar la cáscara de haba, de plátano, de naranja, los residuos de la fabricación de vinos o los jacintos de agua.

Estos residuos vegetales se ponen en contacto con el agua contaminada, produciéndose una extracción en fase sólida de los iones metálicos. Una vez pasado el tiempo de extracción se retira la biomasa, reduciéndose la carga contaminante del agua. Una vez finalizado el proceso los residuos vegetales deben someterse a tratamiento de descontaminación antes de ser desechados.

3.4. Factores que influyen en la capacidad de biosorción metálica

La capacidad de biosorción que presenta una biomasa depende de muchos factores, tanto los propios de la naturaleza de la biomasa como los químicos o físicos que se tienen cuando se produce el proceso de biosorción. Algunos ejemplos de estos factores son los expuestos a continuación:

3.4.1. La naturaleza del biosorbente

La mayor o menor capacidad de biosorción de la biomasa depende de la cantidad de centros aniónicos que presente, para que puedan interaccionar con los cationes metálicos. Los residuos más eficaces suelen ser los que en su composición albergan una mayor cantidad de compuestos

lignocelulósicos. Estos compuestos se encuentran en las paredes celulares de las plantas y están formados por pectina, hemicelulosa, celulosa y lignina [Tejada-Tovar y col., 2015]. En todos estos compuestos se pueden encontrar grupos hidroxilos y/o carboxilos, que son los principales encargados de la biosorción de los metales, pues actúan como centros aniónicos [Cid y col., 2018]. También es posible la modificación química del biosorbente para aumentar su rendimiento, como por ejemplo la obtención de carbón activado a base de biomasa obtenida de lodos y bagazo de caña de azúcar [Tao y col., 2015].

Los biosorbentes pueden estar vivos, como por ejemplo los microorganismos, algas u hongos, en cuyo caso se habla de procesos de bioacumulación (procesos que involucran células vivas); o inertes o muertos, como las cáscaras de frutas, plantas o algas secas, tratándose en este caso de procesos de biosorción [Fomina y Gadd, 2014]. Existen algunas diferencias entre el empleo de biosorbentes vivos o muertos, tales como las que se indican a continuación [Chen y He, 2014; Tejada-Tovar y col., 2015]:

- Los biosorbentes vivos necesitan de nutrientes, mientras que los muertos no necesitan alimentación.
- Los vivos expulsan deposiciones, que pueden contaminar aún más las aguas, mientras que para los muertos no existe ese problema.
- En el caso de los biosorbentes vivos, el proceso de biosorción se paraliza cuando mueren, mientras que para los biosorbentes muertos no existe ese inconveniente.
- Los biosorbentes vivos no se pueden utilizar con alta concentración de metales, pues morirían y se interrumpiría el proceso, mientras que los biosorbentes muertos se pueden utilizar en aguas con altas concentraciones de metales.
- Los biosorbentes muertos pueden llegar a saturarse, mientras que los vivos al alcanzar la saturación el sistema se puede restablecer debido al crecimiento.

Ya que los biosorbentes inertes o muertos necesitan un cuidado menor que los vivos, resultan más económicos y fáciles de usar. Tan solo es necesario realizarle algunos tratamientos previos para ser utilizados, mientras que con los vivos hay que tener un cuidado permanente durante todo el proceso de aplicación de la biomasa.

3.4.2. La temperatura

La temperatura generalmente incrementa la actividad de la carga superficial activa y la energía cinética del biosorbente, mejorando de esta manera la eliminación de iones metálicos por biosorción. Sin embargo, someter al biosorbente a altas temperaturas puede provocar cambios en su estructura y textura, pudiendo producir una disminución de su capacidad de biosorción [Fomina y Gad, 2014].

En función del mecanismo que tenga lugar durante la biosorción, la cinética del proceso depende en mayor o menor grado de la temperatura. Así, cuando tienen lugar procesos químicos durante la biosorción, en la mayoría de los casos la cinética es más rápida y menos dependiente que cuando tienen lugar procesos físicos [Fomina y Gad, 2014].

3.4.3. Valor del pH de la fase acuosa a descontaminar

El valor de pH de la fase acuosa está relacionado estrechamente con la carga que presenta el biosorbente en su superficie, ya que la carga superficial es el resultado de la adsorción de los iones H^+ y OH^- .

Al valor de pH de la disolución para el cual la carga de los centros con carga positiva es igual a los centros con carga negativa se le denomina punto de carga cero (pH_{pzc}). Cuando el pH se encuentra por encima de este valor el biosorbente está cargado negativamente pudiendo interactuar mejor con las especies positivas, como por ejemplo los cationes metálicos, mientras que cuando se encuentra por debajo está cargado positivamente, repeliendo los cationes metálicos [Kapnisti y col., 2018].

3.4.4. La presencia de otros iones competidores y contra-iones

El proceso de biosorción puede estar afectado por la fuerza iónica que presenta la disolución. Al aumentar significativamente su valor puede disminuir la eliminación del metal. Esto se debe a que los iones presentes en el medio pueden competir por los grupos activos disponibles en el biosorbente, en mayor medida para elevados valores de fuerza iónica.

Por otro lado, la fuerza iónica afecta a la solubilidad de los precipitados, esto provoca que a valores pequeños, un aumento de esta fuerza favorezca la solubilidad de algunos hidróxidos metálicos. Debido a lo cual, se permite la biosorción a valores de pH algo superiores que en ausencia de esa fuerza iónica, mejorándose la eficacia del proceso [Fourest y col., 1994; Schneider y col., 2001; Fomina y Gad, 2014; Kapnisti y col., 2018].

Algunos aniones presentes en la disolución también pueden afectar al proceso de biosorción. Esto se debe a que estos iones pueden modificar la especiación del metal, afectar a la especiación de

otros cationes coexistentes en el medio e interaccionar con el propio biosorbente, alterando la capacidad del biosorbente [Fomina y Gad, 2014].

3.4.5. Efecto de la cantidad de biosorbente

Un aumento en la relación biosorbente/disolución, provoca generalmente un incremento del número de centros activos. Esto ocasiona una mayor eficacia en la eliminación de los iones metálicos. Sin embargo, si la relación biosorbente/disolución alcanza valores muy elevados, las partículas de éste pueden agregarse, disminuyendo su superficie y por tanto la cantidad de centros activos [Kapnisti y col., 2018].

3.4.6. El tamaño de partícula

Esencialmente, el proceso de biosorción tiene lugar en los puntos específicos de la superficie de la partícula del biosorbente. Por tanto, la cantidad de metal que puede sorber el biosorbente está directamente relacionada con el volumen de la partícula, que a su vez está relacionado directamente con el área superficial de ésta. Por ello, cuanto más pequeña y porosa es la partícula del biosorbente mayor superficie por unidad de volumen tiene, por tanto, más cantidad de metal puede retener [Tejada-Tovar y col., 2015].

3.5. Aplicaciones de biosorbentes inertes para la retención de metales pesados

Existe un gran interés entre la comunidad científica dedicada al diseño de procesos de eliminación de contaminantes en aguas residuales en encontrar biosorbentes inertes que posean una alta capacidad de biosorción de metales (*Tabla 3.1*).

Tal y como se puede observar en la *Tabla 3.1*, el biosorbente más estudiado es la cáscara de naranja. Esto se debe a que es un residuo agroindustrial muy eficaz, fácil de conseguir, generado en grandes cantidades por las industrias de fabricación de zumos, y con el que se obtienen muy buenos resultados. Su buena capacidad para biorremediar se debe al significativo contenido que tiene en pectina, que fácilmente retiene iones metálicos.

Teniendo en cuenta los beneficios de la utilización de biosorbentes inertes frente a los vivos, se decidió estudiar en el presente trabajo la capacidad como biosorbente muerto la cáscara de naranja amarga verde (*Citrus aurantium*), la semilla de uva de palomino fino (*Vitis vinifera* 'Palomino') y el kumquat (*Citrus japonica*). Los dos primeros se seleccionaron por el beneficio económico que conlleva utilizar residuos agroindustriales, siendo la cáscara de naranja amarga una alternativa frente a

la naranja común; y el último se seleccionó por ser un cítrico de consumo poco extendido, que usualmente solo se utiliza de forma ornamental.

Tabla 3.1. Porcentaje de biosorción de diferentes biosorbentes inertes

Biosorbente inerte	Metal adsorbido	Concentración de bioadsorbente	Porcentaje de biosorción	Bibliografía
Cono de pino	Pb(II)	1,7 g/L	99,9%	[Ofomaja y Naidoo, 2010]
Cono de pino activado con NaOH 0,01 mol/L	Pb(II)	1,1 g/L	99,9%	
Cono de pino activado con NaOH 0,15 mol/L	Pb(II)	0,9 g/L	99,9%	
Residuo solido de té	Ga(III)	10 g/L	77,4%	[Eroglu y col., 2010]
Cáscara de naranja modificada químicamente	Pb(II)	10 g/L	99,5%	[Lasheen y col., 2012]
	Cu(II)		89,57%	
	Cd(II)		81,03%	
Cáscara de naranja	Pb(II)	4 g/L	99,73%	[Ordoñez, 2015]
Cáscara de naranja	Cr(VI)		91,60%	[Ordoñez, 2015]
Cáscara de café	Cr(VI)	2 g/L	93%	[Mohammed y Sahu, 2015]
Corteza de eucalipto	Cr(VI)		99%	[Mohammed y Sahu, 2015]
Cáscara de plátano activado con acrilonitrilo	Cr(VI)	4 g/L	96%	[Ali y col., 2015]
Serrín	Cr(VI)	2 g/L	91,5%	[Mohammed y Sahu, 2015]
Cáscara de pepino	Pb(II)	2 g/L	96%	[Basu y col., 2017]
Cáscara de plátano activado con acrilonitrilo	Mn(II)	4 g/L	94%	[Ali, 2017]
Colza	Pb(II)	10 g/L	94,47%	[Morosanu y col., 2017]

4. OBJETIVOS

Existe un aumento creciente de la concienciación sobre el grave problema que acarrea la contaminación de la Tierra. Especial atención merece la referida al medio acuático, ya que la superficie de agua constituye tres cuartas partes de la del planeta. Algunos de los contaminantes más peligrosos son los metales pesados, debido a su alta toxicidad, su capacidad de bioacumulación y su persistencia en el medio. El aumento de las concentraciones de estas especies, experimentado en las últimas décadas, se debe principalmente a las actividades industriales, pues los metales pesados están presentes en casi todas ellas y pueden llegar a sus aguas residuales. Si estas aguas no son bien depuradas al ser liberadas de la industria, acaban contaminando los ríos, lagos o mares. Por esta razón nuevas tendencias como la biorremediación, consistente en emplear biomásas capaces de retener contaminantes, han aumentado de forma exponencial en los últimos tiempos, especialmente las enfocadas en el uso de residuos biológicos accesibles económicamente para las industrias.

Por todo lo expuesto, el principal objetivo del presente trabajo fin de grado es encontrar un residuo vegetal con alto porcentaje de biosorción, que sea económico y abundante, para desarrollar un método de biorremediación de aguas contaminadas y contribuir a la conservación del ecosistema. Se pretende estudiar el potencial uso que tiene como biosorbente la cáscara de naranja amarga verde (*Citrus aurantium*), el kumquat (*Citrus japonica*) y la semilla de uva palomino fino (*Vitis vinífera* 'Palomino'). Para conseguir alcanzar este objetivo general, se establecen las siguientes actividades:

- I. Estudio comparativo de los porcentajes de biosorción de diversos metales por parte de las biomásas propuestas, para focalizar el estudio en la biomasa que retenga el metal con mejores resultados.
- II. Optimización de algunas variables importantes en la biosorción metálica, tales como: pH, tiempo y cantidad de biomasa para el proceso de biosorción elegido (aquel con el que la biomasa y metal que haya evidenciado mejores resultados).
- III. Estudio de las características del método propuesto: rango lineal de aplicación, reproducibilidad, límite de detección y límite de cuantificación.
- IV. Caracterización de la biomasa elegida, estudiando la densidad aparente, la carga superficial negativa y la capacidad de adsorción de yodo, con el objetivo de establecer su aplicabilidad como biosorbente en procesos de biorremediación.

5. MATERIALES, MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Material y métodos

5.1.1. Materiales, reactivos y equipos

A continuación, en la *Tabla 5.1.* se detallan las especificaciones de todos los equipos y materiales utilizados a lo largo de este Trabajo de Fin de Grado. Además, en la *Tabla 5.2.* se recogen la calidad, la marca y el país de fabricación de los reactivos utilizados.

Tabla 5.1. Equipos utilizados en el presente trabajo

Equipos y material	Especificaciones
Agitador transversal	HS 501 D, IKA Labortechnik, Alemania
Balanza	Mettler PM480, DeltaRange, Suiza
Bomba de vacío	D95, Dinko Instruments, España
Campana de flujo laminar	870 FL, Cruma, España
Centrífuga	Cencom II, J.P. Selecta, España
Equipo de espectroscopía de absorción atómica con llama	iCE 3000 series, Thermo Scientific, Estados Unidos
Equipo de plasma de acoplamiento inductivo (ICP), equipado con un espectrómetro de emisión óptico (OES)	Iris Intrepid, Termo Elemental, España
Estufa calefactora	J.P. Selecta, España
Filtro de microfibra de vidrio de 4,7 cm de diámetro	Merck Millipore Ltd., Irlanda
pH-metro	Basic 20, Crison, España
Trituradora	Kitchen Tools, SilverCrest, Alemania

Tabla 5.2. Reactivos utilizados en el presente trabajo

Nombre	Calidad	Marca	País de fabricación
Ácido acético concentrado (CH_3COOH)	Para análisis 96%	Merck	Alemania
Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	Para análisis 99,9%	Panreac	España
Ácido clorhídrico (HCl)	Para análisis 37%	Panreac	España
Ácido nítrico (HNO_3)	Purísimo 69%	Panreac	España
Ácido nítrico (HNO_3)	Suprapur 65%	Merck	Alemania
Dicromato Potásico ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)	Para análisis 99,9%	Merck	Alemania
Disolución de almidón ($(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$) 1%	Para análisis 100%	Panreac	España
Disolución de yodo (I_2) 0,01M	Para análisis 100%	Panreac	España
Ftalato ácido de potasio ($\text{KC}_8\text{H}_5\text{O}_4$)	Purísimo 100%	Panreac	España
Hidróxido de sodio (NaOH)	Para análisis 98%	Panreac	Alemania
Nitrato de cadmio ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	Purísimo 100%	Panreac	España
Nitrato de cobalto ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Para análisis 100%	Panreac	España
Nitrato de níquel ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Para análisis 100%	Panreac	España
Nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)	Para análisis 100%	Panreac	España
Patrones estándar de 1000 mg/L de Pb, Co, Ni, Cd, Cr	CertiPur ICP Standard	Merck	Alemania
Tiosulfato de sodio penta-hidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Para análisis 99,5%	Panreac	España

5.1.2. Método de limpieza del material

Cuando se trabaja con disoluciones de metales, sobre todo a niveles traza, es de gran importancia evitar que se puedan producir episodios de contaminación durante los ensayos. Por eso la limpieza es un punto clave que hay que tener muy en cuenta a la hora de realizar estas experiencias.

En primer lugar, se lava el material con agua y jabón. Se realiza posteriormente un enjuague con agua desionizada y otro con una disolución de HNO_3 cuya concentración es 2 mol/L. Para finalizar, cuando se trabaja determinando metales a nivel de mg/L (ppm) se realizan tres enjuagues con agua desionizada y se deja secar en una campana de flujo laminar de ambiente controlado, evitando así la contaminación del material durante el tiempo de secado. En los casos en los que se determinen metales a nivel de $\mu\text{g/L}$ (ppb) los tres enjuagues con agua desionizada se sustituyen por tres enjuagues con agua desionizada Milli-Q.

5.1.3. Tratamientos previos realizados a las distintas biomásas

En este trabajo se han utilizado varios tipos de biomásas: cáscara de naranja amarga verde (*Citrus aurantium*), kumquat (*Citrus japonica*) y semilla de uva palomino fino (*Vitis vinifera* 'Palomino'), esta última recogida tras el proceso de vinificación.

Las biomásas se someten a varios tratamientos previos antes de poder ser utilizadas en los diferentes ensayos. En primer lugar, se lava el sólido con un poco de agua para así retirar cualquier resto de tierra y suciedad. A continuación, se trocea, para facilitar el secado, y se introduce en la estufa hasta observar que se ha eliminado toda el agua. Para ello se pesa periódicamente el sólido hasta observar que su valor se mantiene constante. La temperatura de secado, tal y como está recogida en la *Tabla 5.3*, entre 40-45 °C según la biomasa, para conseguir un secado lento.

Tabla 5.3. Temperatura de secado de los sólidos biosorbentes

Sólido Biosorbente	Tª de secado (°C)
Cáscara de naranja amarga verde (<i>Citrus aurantium</i>)	45
Kumquat (<i>Citrus japonica</i>)	40
Semilla de uva palomino fino (<i>Vitis vinifera</i> 'Palomino')	40

Posteriormente, el sólido seco se tritura en una trituradora (*Ilustración 5.1*) y se moltura en un mortero de ágata (*Ilustración 5.2*).

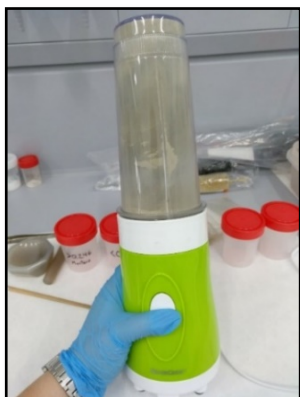


Ilustración 5.1. Proceso de triturado



Ilustración 5.2. Proceso de molturado

Una vez triturado y molturado, se procede al paso del tamizado (*Ilustración 5.3*). El objetivo de éste es tener una fracción homogénea y fina de sólido, con un tamaño de partícula menor de 0,125 mm. Para ello se utilizan dos tamices, uno de 0,246 mm y otro de 0,125 mm de tamaño de luz de paso. Este proceso se lleva a cabo en dos etapas:

- En la primera etapa, se pasa el sólido por el tamiz de 0,246 mm de luz. El sólido que no pasa se vuelve a triturar, molturar y tamizar de nuevo. Una vez obtenida la máxima cantidad de sólido posible se pasa a la siguiente etapa.
- En la segunda etapa, se pasa el sólido anteriormente obtenido por el tamiz de 0,125 mm de luz.

Todo este proceso se realiza de igual forma para cada tipo de sólido biosorbente a estudiar.



Ilustración 5.3. Proceso de tamizado (tamiz de 0,125 mm de luz)

5.1.4. Preparación de las disoluciones reguladoras

La finalidad de la disolución reguladora es controlar el pH de la disolución de metal durante el tiempo que transcurre el ensayo. En estos ensayos se utilizan dos reguladoras diferentes, una de ellas de ácido acético-acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$) de 1 mol/L a pH 3,5; pH 4,5; pH 4,8 y pH 5,5 y otra, de ácido cítrico-citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7-\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) de 2 mol/L a pH 6. Para preparar la disolución reguladora de $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ se añade hidróxido de sodio sobre 30 mL de CH_3COOH hasta el pH deseado y se enrasa con agua desionizada hasta 500 mL. Para preparar la disolución reguladora de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7-\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ se disuelven 96,54 g de ácido cítrico con un poco de agua, se añade hidróxido de sodio hasta el pH deseado y se enrasa con agua hasta 250 mL.

Para conservarlas se introducen en botes de polietileno de baja densidad de 500 mL y de 250 mL, respectivamente, para su posterior almacenamiento en el frigorífico.

5.1.5. Preparación de las disoluciones de metal (Disolución A)

Estas disoluciones se preparan en el momento previo a ser utilizadas, para evitar así la posible precipitación del metal. En la preparación de las disoluciones metálicas se utilizan las siguientes sales: $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Estas disoluciones se preparan en un matraz de 250 mL y tienen una concentración de 1 mmol/L de metal. En primer lugar, se disuelve la cantidad adecuada de sal, recogida en la *Tabla 5.4*, se ajusta el pH usando alguna de las reguladoras anteriormente mencionadas a una concentración final de 0,1 mol/L para la reguladora de $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ y 0,08 mol/L para la reguladora de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7-\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, o bien se añade una cantidad adecuada de ácido clorhídrico, y por último se enrasa con agua Milli-Q. A continuación, se muestra un ejemplo de los cálculos a realizar para obtener los gramos de sal necesarios para preparar la disolución metálica de concentración 1 mmol/L de Co(II):

$$1 \text{ mM} = \frac{n_{\text{Co(II)}}}{0,25 \text{ L}} \quad (1)$$

$$n_{\text{Co(II)}} = 0,25 \text{ mmoles} = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ moles de Co(II)} \quad (2)$$

$$2,5 \cdot 10^{-4} \text{ moles Co(II)} \cdot \frac{1 \text{ mol Co(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol Co(II)}} = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ moles Co(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \quad (3)$$

$$2,5 \cdot 10^{-4} \text{ moles Co(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \cdot \frac{291,03 \text{ g Co(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol Co(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}} = 0,073 \text{ g Co(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \quad (4)$$

Tabla 5.4. Cantidad de sal necesaria para preparar las disoluciones metálicas (1 mmol/L) en 250 mL

Sal	Cantidad de sal (g)
$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,077
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,073
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	0,037
$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,073
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0,083

5.1.6. Preparación de la disolución de control (Disolución B)

Estas disoluciones de control o blancos permiten conocer el comportamiento del sistema en ausencia de metal añadido. Se preparan en un matraz de 100 mL, añadiendo el volumen adecuado de alguna de las reguladoras anteriormente mencionadas para obtener una concentración de 0,1 mol/L en el caso de $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ o 0,08 mol/L en el caso de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7-\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, o bien añadiendo la cantidad adecuada de ácido clorhídrico y enrasando con agua desionizada. De esta forma se obtiene una disolución control con la misma matriz que la disolución A, pero sin metal.

5.1.7. Ensayos para determinar la capacidad biosorbente de las biomasas seleccionadas

Para cada ensayo es necesario disponer de cuatro botes de polipropileno con tapón de rosca de 100 mL de capacidad. A tres de estos botes se les adicionan una cierta cantidad de sólido biosorbente pesado en balanza y se enumeran como botes 1, 2 y 3. Es muy importante anotar el peso exacto de la cantidad de sólido biosorbente que se adiciona, ya que hay que tenerlo en cuenta a la hora de calcular el porcentaje de metal adsorbido por cantidad de biomasa. A continuación, a los botes 1 y 2 se les añaden 50 mL de Disolución A, al bote 3 se le añaden 50 mL de Disolución B y al bote 4, que no tiene sólido, se le añaden 50 mL de Disolución A. De esta manera se tienen dos botes (bote 1 y bote 2), réplica uno del otro, con sólido biosorbente y disolución metálica. Otro bote, nombrado como 3, con sólido biosorbente y disolución sin metal. Y un último bote, nombrado como 4, que solo tiene 50 mL de disolución metálica. De esta forma, el bote 3 sirve como referencia para saber si la biomasa o la Disolución B tienen en su composición cantidades apreciable del metal al que corresponde el ensayo. Y el bote 4 sirve como referencia para saber cómo se comporta la disolución de metal sin biomasa durante el ensayo, y utilizarlo como referencia para realizar los cálculos del porcentaje de biosorción. Todo esto se resume en la *Ilustración 5.4*.

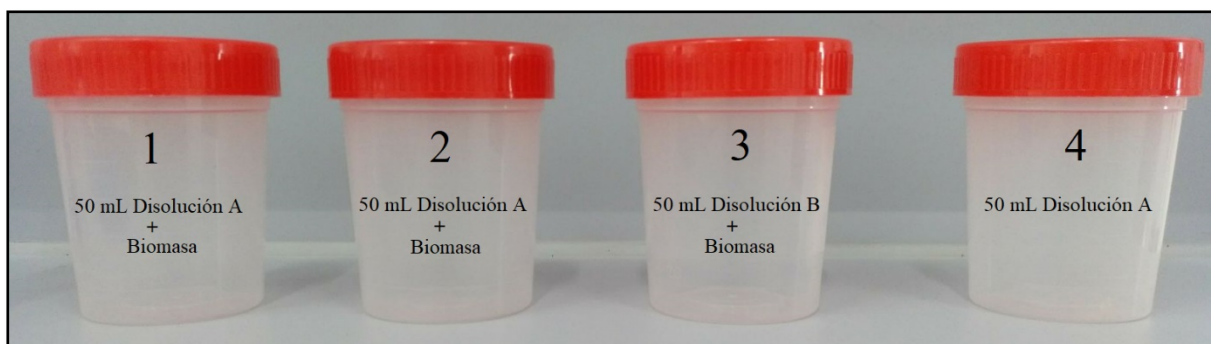


Ilustración 5.4. Resumen ilustrado de la composición de los botes para el ensayo

Una vez los botes están preparados, se mide el pH de cada disolución y se colocan en un agitador horizontal (*Ilustración 5.5*) durante un tiempo determinado a una velocidad de 200 tpm (traslaciones/min) aproximadamente y 23 °C.



Ilustración 5.5. Ensayos colocados en el agitador horizontal

Tras el tiempo de agitación se vuelve a medir el pH, para verificar que éste se ha mantenido constante, y se filtra la disolución. Para realizar la filtración se utiliza un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío. Sobre el Kitasato se coloca una placa filtrante junto con un filtro de microfibra de vidrio de 4,7 cm de diámetro y un vaso sujeto a la placa filtrante con una pinza (*Ilustración 5.6*).

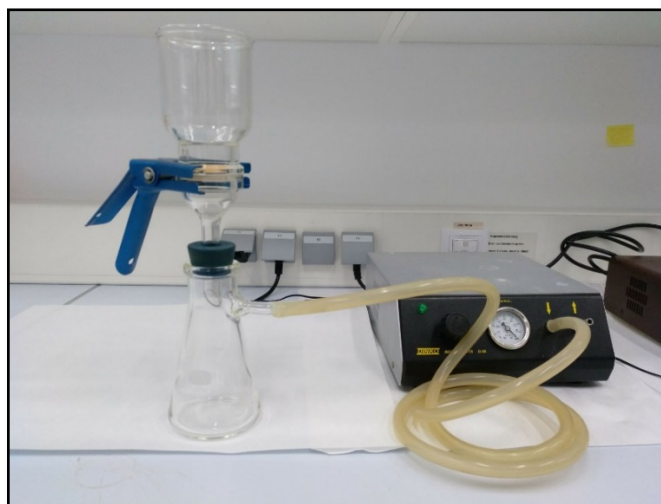


Ilustración 5.6. Sistema de filtración

Tras la filtración se acidifican las disoluciones añadiéndoles 100 μL de ácido nítrico concentrado calidad suprapur, para evitar que el metal precipite. Por último, en el caso que fuera necesario, se realizan las diluciones correspondientes recogidas en la *Tabla 5.5* para que, al analizar los extractos mediante espectroscopía de absorción atómica con llama, las concentraciones se encuentren dentro de la recta de calibrado de cada metal.

Tabla 5.5. Diluciones realizadas sobre los diferentes extractos para cada metal

Sólido biosorbente	Ensayo	Cobalto (II)	Níquel (II)	Plomo (II)	Cadmio (II)	Cromo (VI)
Cáscara de naranja amarga verde (<i>Citrus aurantium</i>)	Disolución A + Sólido	1:20	1:10	1:50	1:50	1:10
	Disolución A + Sólido	1:20	1:10	1:50	1:50	1:10
	Disolución B + Sólido	1:20	1:10	1:50	1:50	1:10
Semilla de uva palomino fino (<i>Vitis vinifera</i>)	Disolución A + Sólido	1:20	1:10	1:5	1:50	Sin Dilución
	Disolución A + Sólido	1:20	1:10	1:5	1:50	Sin Dilución
	Disolución B + Sólido	1:20	1:10	1:5	1:50	Sin Dilución
Kumquat (<i>Citrus japonica</i>)	Disolución A + Sólido	1:30	1:10	1:50	1:50	1:10
	Disolución A + Sólido	1:30	1:10	1:50	1:50	1:10
	Disolución B + Sólido	1:30	1:10	1:50	1:50	1:10
Sin sólido	Disolución A	1:30	1:10	1:100	1:100	1:10

5.1.8. Determinación de la concentración de metal mediante espectroscopía de absorción atómica con llama

Para llevar a cabo la determinación de la concentración de metal en las disoluciones de los ensayos, se utiliza un equipo de espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS) (*Ilustración 5.7*). En primer lugar, se optimizan la altura del mechero, el flujo de gas oxidante y el flujo combustible para cada metal. Una vez optimizados estos parámetros del equipo, se mide la recta de calibrado, para a continuación medir los extractos resultantes de los ensayos descritos en el apartado 5.1.8. Todo esto adoptando las condiciones instrumentales aconsejadas por el equipo, que se recogen en la *Tabla 5.6*.

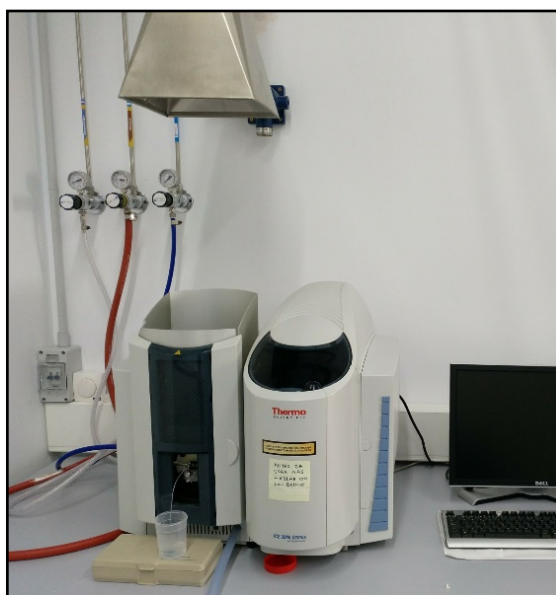


Ilustración 5.7. Equipo de absorción atómica con llama

Tabla 5.6. Condiciones instrumentales empleadas para la determinación de los diferentes metales en el equipo de espectroscopía de absorción atómica con llama

Metal	Cobalto	Níquel	Plomo	Cadmio	Cromo
Longitud de onda (nm)	240,73	232,00	283,31	228,80	357,78
Rendija (nm)	1,8/1,35	1,8/1,35	2,7/1,05	2,7/1,35	2,7/0,8

Para preparar las rectas de calibrado, se consultan en las especificaciones del equipo la sensibilidad que tiene en condiciones óptimas de medida. A partir de estos datos se diseña la curva de calibrado a utilizar. Para preparar los patrones que van a formar parte de la recta de calibrado, se parte de una disolución estándar de 1000 mg/L de metal. Como el volumen a tomar de esta disolución para

realizar los patrones es muy pequeño, se prepara una disolución intermedia de 50 mg/L, de forma que el volumen a tomar sea mayor y disminuya el error del pipeteo. A partir de esta disolución de 50 mg/L, se preparan los puntos de la recta de calibrado con las concentraciones recogidas en la *Tabla 5.7*, en matraces de 25 mL de polipropileno y enrasando con agua Milli-Q. Es muy importante añadirle, previo a su enrase, ácido nítrico suprapur concentrado de tal manera que la concentración de ácido sea 0,03 mol/L, para acidificar y así evitar que precipite el metal.

Tabla 5.7. Concentraciones de los patrones de la recta de calibrado para cada metal

Nº de patrón	Co (mg/L)	Ni (mg/L)	Pb (mg/L)	Cd (mg/L)	Cr (mg/L)
0	0	0	0	0	0
1	0,5	1	0,5	0,1	1
2	1	3	1	0,25	2
3	1,5	4	1,5	0,5	3
4	2	5	2	0,75	4
5	2,5	6	2,2	1	5
6	3	7	2,5	1,25	6
7	3,5	8	3	1,6	7

5.1.9. Determinación de la concentración de metal mediante espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo ICP-OES

Debido a un problema técnico con el equipo de absorción atómica con llama, los ensayos finales se realizaron con un equipo de emisión atómica con atomización con plasma de acoplamiento inductivo (ICP), equipado con un espectrómetro de emisión óptico (OES). Las rectas de calibrado que se utilizaron para medir en este equipo se recogen en la *Tabla 5.8*, y las diluciones realizadas sobre los diferentes extractos con cada metal se encuentran en la *Tabla 5.9*.

Tabla 5.8. Concentraciones de los patrones de la recta de calibrado para cada metal para ICP-OES

Nº de patrón	Pb (mg/L)	Cr (mg/L)
0	0	0
1	0,5	0,5
2	2,5	2,5
3	5	5
4	10	10
5	20	20
6	30	30
7	40	40
8	60	60

Tabla 5.9. Diluciones realizadas sobre los diferentes extractos con cada metal para ICP-OES

Sólido biosorbente	Ensayo	Pb (reguladora CH_3COOH - CH_3COONa)	Pb (reguladora $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ - $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	Cr (ambas reguladoras)
Semilla de uva palomino fino (<i>Vitis vinifera</i>)	Disolución A + Sólido	Sin Dilución	1:10	Sin Dilución
	Disolución A + Sólido	Sin Dilución	1:10	Sin Dilución
	Disolución B + Sólido	Sin Dilución	Sin Dilución	Sin Dilución
Sin sólido	Disolución A	1:10	1:10	Sin Dilución

5.1.10. Optimización de la metodología propuesta: Diseño de experimento 2^3

Después de realizar estudios previos con las biomásas y metales indicados, se decide optimizar el proceso utilizando como biomasa la semilla de uva palomino fino, para la biosorción de Cr(VI) ya que parece ofrecer buenos resultados. Para ello se realiza un diseño de experimento que permite optimizar las variables que afectan al proceso de biosorción de forma eficaz. El diseño propuesto es un diseño factorial 2^3 con dos réplicas de cada punto y dos réplicas del punto central. Para tratar los resultados se utilizan los programas informáticos Statistica 7 y Statgraphics XVII.

5.1.11. Caracterización de la biomasa seleccionada

5.1.11.1. Determinación de la densidad aparente de la biomasa

Para determinar la densidad aparente de la biomasa se pesa un matraz de 10 mL, sin tapón, perfectamente limpio y seco (ese valor recibe el nombre de P0). A continuación, se añade una cantidad de biomasa pesada previamente (P1). Luego se pesa el matraz con la biomasa (P2), se enrasa el matraz con agua desionizada y se pesa de nuevo (P3). Una vez pesado el matraz con la suspensión acuosa de biomasa, se vacía, se limpia, se enrasa con agua desionizada y se pesa de nuevo (P4). Este estudio se realiza por duplicado. Los cálculos necesarios para determinar la densidad de la biomasa se describen a continuación:

$$V1 = \frac{P3-P2}{\text{Densidad del agua } 24^{\circ}\text{C}} \quad (5)$$

donde “V1” es el volumen de agua necesario para enrasar el matraz que contiene biomasa.

$$V2 = \frac{P4-P0}{\text{Densidad del agua } 24^{\circ}\text{C}} \quad (6)$$

donde “V2” es el volumen de agua necesario para enrasar el matraz.

$$V_{\text{biomasa}} = V2-V1 \quad (7)$$

donde “V_{biomasa}” es el volumen que ocupa la cantidad de biomasa que se añade en el matraz.

$$\text{Densidad de la biomasa} = \frac{P1}{V_{\text{biomasa}}} \quad (8)$$

5.1.11.2. Determinación de la capacidad de adsorción de yodo de la biomasa

La medida de la adsorción de yodo por la biomasa se emplea para medir la capacidad de adsorción que tiene la biomasa. Para determinarla se sigue el procedimiento recogido propuesto por Pholosi [Pholosi y col., 2013]. Para ello se toman 0,011 g de biomasa que se disponen en un bote de polipropileno con tapón de rosca. Luego se añaden 25 mL de una disolución de yodo 0,005 mol/L. Tras este proceso, se deja agitando durante 24 horas para asegurar que se alcanza el equilibrio de adsorción. Una vez pasadas las 24 horas se filtra la disolución resultante a vacío y se toman dos alícuotas de 10 mL. Estas alícuotas se valoran con tiosulfato de sodio 0,005 mol/L, que ha sido previamente factorizado con una disolución de K₂Cr₂O₇ 8,8 mmol/L.

A continuación, se muestran los cálculos necesarios para la obtención de la capacidad de adsorción de yodo. En primer lugar, los moles de tiosulfato de sodio que se consumen durante su factorización se pueden calcular de la siguiente manera:

$$mol Na_2S_2O_3 = M_{Na_2S_2O_3 \text{ factorizado}} \left(\frac{mol}{L} \right) \cdot V_{Na_2S_2O_3 \text{ gastado}}(L) \quad (9)$$

Como la relación entre el I_2 y el $Na_2S_2O_3$ es 1:2, según la siguiente reacción:



los moles de I_2 que quedan sin adsorber en la alícuota que se valora, se pueden calcular de la siguiente manera:

$$n(I_2)_{na} \text{ en la alícuota de } 10 \text{ mL} = \frac{mol Na_2S_2O_3}{2} \quad (10)$$

donde “ $n(I_2)_{na}$ ” es el número de moles de I_2 no adsorbidos por la biomasa.

Para conocer los moles de I_2 no adsorbidos en los 25 mL se multiplica por 2,5:

$$n(I_2)_{na} \text{ en } 25 \text{ mL} = 2,5 \cdot (n(I_2)_{na} \text{ en } 10 \text{ mL}) \quad (11)$$

Para calcular los moles de I_2 adsorbidos por la biomasa ($n(I_2)_a$), se restan los moles de I_2 que se añaden inicialmente menos los moles de I_2 no adsorbidos en los 25 mL:

$$n(I_2)_a = 0,025 \text{ L} \cdot M_{I_2} - n(I_2)_{na} \text{ en } 25 \text{ mL} \quad (12)$$

Una vez calculados los moles de I_2 adsorbidos por la biomasa, se pasa a mg ya que la unidad de la capacidad de adsorción de I_2 es mg/g biomasa:

$$n(I_2)_a \cdot \frac{253,8 \text{ g } I_2}{1 \text{ mol } I_2} \cdot \frac{1000 \text{ mg } I_2}{1 \text{ g } I_2} = \text{mg de } I_a \text{ adsorbidos} \quad (13)$$

Finalmente, los mg de I_2 adsorbidos por la biomasa se dividen entre los gramos de biomasa que se han utilizado:

$$\text{Capacidad de adsorción de } I_2 = \frac{\text{mg adsorbidos de } I_2}{\text{cantidad inicial de biomasa (g)}} \quad (14)$$

5.1.11.3. Determinación de la carga superficial negativa de la biomasa

Este procedimiento se basa en una valoración con una base fuerte, como por ejemplo el hidróxido de sodio, que al añadirla a la biomasa produce la desprotonación de los grupos ionizables fuertes y débiles que están contenidos en la misma y que contribuyen a la carga total negativa.

Para determinar la carga superficial negativa se sigue el procedimiento descrito por Pholosi [Pholosi y col., 2013]. Para ello se toma un peso aproximado de 0,5 g de biomasa y se disponen en un bote de polipropileno con tapón de rosca y se añaden 25 mL de una disolución de NaOH de 0,1 mol/L previamente factorizada con ftalato ácido de potasio ($KC_8H_5O_4$) sobre el sólido. A continuación, se

coloca el bote en un agitador transversal a 300 tpm durante 24 h. Tras las 24 h se separa el líquido del sólido mediante centrifugación, se toman dos alícuotas de 10 mL cada una y se les adicionan 15 mL de una disolución de HCl de 0,1 mol/L para prevenir cualquier posible disolución de CO₂ atmosférico. Estas disoluciones se valoran con la disolución de NaOH de 0,1 mol/L, previamente factorizada. Todo este proceso se realiza por duplicado.

A continuación, se muestran los cálculos necesarios para la obtención de la carga superficial negativa. En primer lugar, se calculan los moles de HCl que existen en la disolución valorada:

$$mol\ HCl = mol\ NaOH = M_{NaOH\ factorizado} \left(\frac{mol}{L} \right) \cdot V_{NaOH\ gastado}(L) \quad (15)$$

Estos moles de HCl que hay en la disolución valorada equivalen a la diferencia entre los moles de HCl que se añaden inicialmente a la alícuota de 10 mL y los moles de NaOH que hay en la alícuota de 10 mL que no han reaccionado con la biomasa durante el proceso de agitación.

$$mol\ HCl = 0,015\ L \cdot M_{HCl} - n\ (NaOH) \quad (16)$$

donde “n (NaOH)” es el número de moles de NaOH en la alícuota de 10 mL que no reaccionan con la biomasa.

Una vez obtenidos los moles de NaOH que hay en la alícuota de 10 mL, se calculan cuántos moles de NaOH hay en los 25 mL iniciales:

$$n\ (NaOH)\ en\ 25\ mL = 2,5 \cdot (n(NaOH)\ en\ 10\ mL) \quad (17)$$

Estos moles totales de NaOH que no han reaccionado con la biomasa (n (NaOH) en 25 mL) equivalen a los moles de NaOH que hay inicialmente en los 25 mL menos los moles que han reaccionado con la biomasa.

$$n\ (NaOH)\ en\ 25\ mL = 0,025L \cdot M_{NaOH} - b \quad (18)$$

donde “b” es el número de moles de NaOH que han reaccionado con la biomasa.

Estos moles de NaOH que reaccionan con la biomasa equivalen a los moles de H⁺ que contiene la misma. Por último, se calcula la carga superficial negativa de la biomasa de la siguiente manera:

$$Carga\ superficial\ negativa = \frac{mmol\ H^+}{cantidad\ inicial\ de\ biomasa\ (g)} \quad (19)$$

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Comparación de los porcentajes de biosorción de metales para las diferentes biomásas

Para llevar a cabo la comparación de la eficacia de biosorción de metales pesados se realizaron los ensayos descritos en el apartado 5.1.7, a dos valores de pH diferentes, usando como biomasa la semilla de uva palomino fino, el kumquat y la cáscara de naranja amarga verde. La cantidad de biomasa que se adiciona a la disolución a remediar fue de 10 g/L, con un tamaño de partícula menor de 0,125 mm. Además, se utilizó un tiempo de agitación de 24 h. El control del pH de la disolución se realizó mediante adición de disolución reguladora de CH₃COOH-CH₃COONa de pH 4,8 (ver apartado 5.1.4), mientras que para acondicionar la muestra a pH 3 se adicionó ácido clorhídrico.

Se evaluaron los porcentajes de biosorción para cadmio (II), cobalto (II), cromo (VI), níquel (II) y plomo (II), y los resultados que se obtuvieron fueron los que aparecen recogidos en la Tabla 5.10. Para realizar el cálculo del porcentaje de biosorción se utilizó la siguiente expresión:

$$\% \text{ biosorción} = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \cdot 100 \quad (20)$$

donde “C₀” es la concentración inicial de metal en la disolución acuosa, y “C_f” es la concentración metálica tras el periodo de agitación de la disolución en presencia de biomasa.

Tabla 5.10. Porcentajes de biosorción de cadmio, cobalto, cromo, níquel y plomo para diferentes pH y biomásas (metal en la disolución: 1 mmol; tamaño de partícula < 0,125 mm; tiempo de agitación 24 h; 10 g biomasa/L de disolución)

Biomasa	% Cd(II)		% Co(II)		% Cr(VI)		% Ni(II)		% Pb(II)	
	pH		pH		pH		pH		pH	
	3	4,8	3	4,8	3	4,8	3	4,8	3	4,8
Cáscara de naranja amarga verde	42,8	37,3	39,2	30,5	23,4	21,0	38,4	25,5	73,5	65,5
Kumquat	38,0	29,2	24,2	9,1	n.a.	n.d.	22,0	8,7	55,0	32,8
Semilla de uva palomino fino	25,1	30,8	13,6	18,6	67,4	87,4	12,6	13,4	87,2	89,0

n.a.: no analizado

n.d.: no detectado

Los resultados obtenidos se pueden resumir de la siguiente manera:

- Cadmio (II): La biosorción a pH 3 presentó el siguiente orden de mayor a menor: cáscara de naranja amarga verde > kumquat > semilla de uva palomino fino. Y para pH 4,8 fue: cáscara de naranja amarga verde > semilla de uva palomino fino > kumquat.
- Cobalto (II): En este otro caso, la biosorción también presentó un orden diferente según el pH del ensayo. Para pH 3, el orden de mayor a menor fue el siguiente: cáscara de naranja amarga verde > kumquat > semilla de uva palomino fino. Y para pH 4,8: cáscara de naranja amarga verde > semilla de uva palomino fino > kumquat.
- Cromo (VI): El orden del porcentaje de biosorción de mayor a menor fue: semilla de uva palomino fino > cáscara de naranja > kumquat. Para la semilla de uva palomino fino se obtuvo el mayor porcentaje de biosorción a pH 4,8.
- Níquel (II): Para este metal el orden en el porcentaje de biosorción también varió según el pH de la disolución. Para valores de pH 3, este orden fue el siguiente de mayor a menor: cáscara de naranja amarga verde > kumquat > semilla de uva palomino fino. Y para pH 4,8: cáscara de naranja amarga verde > semilla de uva palomino fino > kumquat.
- Plomo (II): El porcentaje de biosorción siguió el siguiente orden de mayor a menor: semilla de uva palomino fino > cáscara de naranja amarga verde > kumquat. Para la semilla de uva palomino fino se obtuvo el mayor porcentaje de biosorción a pH 4,8.
- Además, tanto para el kumquat como para la cáscara de naranja amarga verde el porcentaje de biosorción disminuye al aumentar el pH, mientras que en el caso de la semilla de uva palomino fino este porcentaje aumenta. Este hecho se repite en todos los metales estudiados.

A la vista de los resultados, puede decirse que la cáscara de naranja amarga verde presenta una buena capacidad de biosorción para la mayoría de los metales estudiados (destacando especialmente su capacidad para retener plomo (II), así como la poca biosorción por cromo (VI)). La semilla de uva palomino fino tiene una capacidad adecuada para tres de los cinco metales (destacando los porcentajes obtenidos de plomo (II) y cromo (VI), mayores que para la cáscara de naranja). Por último, el kumquat es la biomasa que menos perspectivas ofrece para ser competitiva en la biosorción de metales.

Debido al aumento que presentó el porcentaje de biosorción de cromo (VI) y plomo (II) con la semilla de uva palomino fino al aumentar el pH (*Tabla 5.10*) se decidió estudiar qué ocurría a pH 6. Para ello se realizaron los ensayos descritos en el *apartado 5.1.7* para la semilla, con la reguladora de ácido cítrico-citrato de sodio descrita en el *apartado 5.1.4*. Se obtuvieron unos resultados de

biosorción de cromo (VI) del 54,7% y del 10,6% para el plomo (II), valores menores a los encontrados con pH 3 y pH 4,8. Así pues, se decidió descartar el valor de pH 6 para los estudios posteriores.

Debido a que ya existen estudios en la bibliografía sobre la biosorción de plomo (II) con diversos tipos de biomasa inerte, se decidió centrar los estudios posteriores del presente trabajo en la biosorción de cromo (VI) ya que dio muy buenos resultados empleando la semilla de uva palomino fino. Otro factor que se tuvo en cuenta a la hora de seleccionar esta biomasa fue su fácil adquisición y bajo coste, condiciones que se propician en la provincia de Cádiz gracias a su carácter vitivinícola. En esta zona se genera cada año una gran cantidad de residuos tras la vinificación (a los que no se les da uso o tienen un uso muy reducido), entre los que se encuentra la semilla de uva. Por ello, la utilización de este tipo de biomasa se considera una alternativa muy interesante para el desarrollo de un método de biorremediación de aguas contaminadas.

5.2.2. Optimización de la metodología propuesta: Diseño de experimento 2³

Las variables que se optimizaron en los ensayos de biosorción fueron: tiempo de agitación, pH de la disolución a remediar y concentración de biomasa. Para ello, se decidió realizar un diseño de experimento factorial 2³ con dos réplicas de cada punto y dos puntos centrales. Este diseño propone la realización de 20 experimentos en total, combinando dos niveles para cada variable, -1 y +1, así como un punto central 0, que se encuentran descritos en la *Tabla 5.11*. En la *Tabla 5.12* se describen los valores de estos tres niveles utilizados (nivel superior +1, punto central 0 y nivel inferior -1) para cada variable. El resto de los parámetros de los ensayos permanecieron constantes:

- Biomasa: Semilla de uva palomino fino
- Tamaño de partícula: < 0,125 mm
- Metal: Cromo (VI)
- Concentración inicial del metal: 1 mmol/L
- Velocidad de agitación: 200 tpm
- Temperatura: 23 °C
- Disolución Reguladora: CH₃COOH-CH₃COONa en una concentración final de 0,1 mol/L en la disolución a remediar

En la *Tabla 5.13* se detallan las condiciones para estos 20 experimentos junto con el porcentaje de biosorción obtenido para cada uno de ellos.

Tabla 5.11. Matriz de las variables del diseño de experimento 2^3 con los valores codificados

Experimento	pH	Biomasa (g/L)	Tiempo (h)
1	1	1	1
2	1	1	-1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	0	0	0
6	1	-1	-1
7	-1	-1	-1
8	1	-1	1
9	-1	-1	1
10	0	0	0
11	1	1	1
12	1	1	-1
13	-1	1	-1
14	-1	1	1
15	0	0	0
16	1	-1	-1
17	-1	-1	-1
18	1	-1	1
19	-1	-1	1
20	0	0	0

Tabla 5.12. Valores de las variables a optimizar para cada nivel del diseño de experimento 2^3

Variable	Nivel inferior (-1)	Punto central (0)	Nivel superior (1)
pH	3,5	4,5	5,5
Biomasa (g/L)	5	10	15
Tiempo (h)	8	16	24

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el diseño de experimento se llevó a cabo utilizando los programas descritos en el apartado 5.1.10. Inicialmente se realizó un estudio estadístico de diseño de experimento cuadrático para saber si las variables presentaban una tendencia lineal o presentaban curvatura. Tal y como se observa en el diagrama de Pareto (Figura 5.1) la curvatura no es significativa debido a que tiene un nivel de significación “p” por encima de 0,05 ($p = 0,722$).

Tabla 5.13. Eficacia de la biosorción de Cr(VI) para cada experimento del diseño factorial 2^3

Experimento	pH	Biomasa (g/L)	Tiempo (h)	% Cr(VI)
1	5,5	15	24	93,5
2	5,5	15	8	92,1
3	3,5	15	8	76,7
4	3,5	15	24	73,4
5	4,5	10	16	82,5
6	5,5	5	8	87,7
7	3,5	5	8	79,6
8	5,5	5	24	89,7
9	3,5	5	24	75,3
10	4,5	10	16	83,0
11	5,5	15	24	93,5
12	5,5	15	8	92,6
13	3,5	15	8	76,9
14	3,5	15	24	73,0
15	4,5	10	16	83,5
16	5,5	5	8	87,8
17	3,5	5	8	80,1
18	5,5	5	24	89,9
19	3,5	5	24	76,1
20	4,5	10	16	83,6

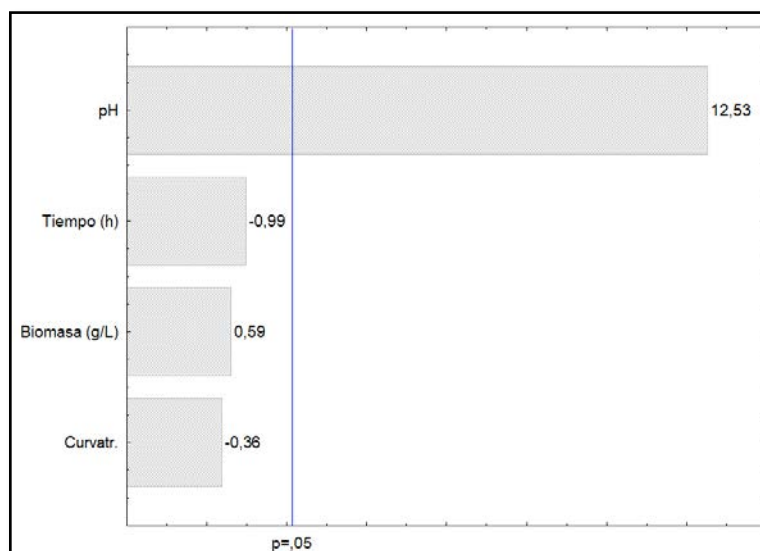


Figura 5.1. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados para la biosorción de cromo (VI) obtenidos en el diseño cuadrático

Una vez comprobada la tendencia lineal de las variables a optimizar para los niveles estudiados, se decidió realizar el análisis estadístico del diseño de experimento sin curvatura. Del nuevo diagrama de Pareto (*Figura 5.2*) se concluye que la única variable significativa ($p < 0,05$) en este estudio es el pH de la disolución a remediar, con una significación positiva ($p = 0,000$). También se concluye que la variable tiempo tiene efecto negativo en el proceso de biosorción, mientras que la concentración de biomasa tiene efecto positivo, aunque ninguna de estas variables son significativas ($p = 0,326$ y $p = 0,549$, respectivamente). Esto también se ve reflejado en el diagrama de los efectos principales para el porcentaje de biosorción (*Figura 5.3*). Al incrementarse el valor de pH 3,5 a pH 5,5 el porcentaje de biosorción de cromo (VI) aumenta considerablemente (*Figura 5.3*), debido a que el pH es una variable significativa con efecto positivo, siendo por tanto la pendiente de este efecto principal en el diagrama muy destacada y positiva. También se observa un leve aumento del porcentaje de biosorción cuando aumenta la concentración de biomasa (aunque no tan apreciable como en el caso del pH) y una leve disminución de dicho porcentaje al pasar de 8 horas de agitación a 24 horas.

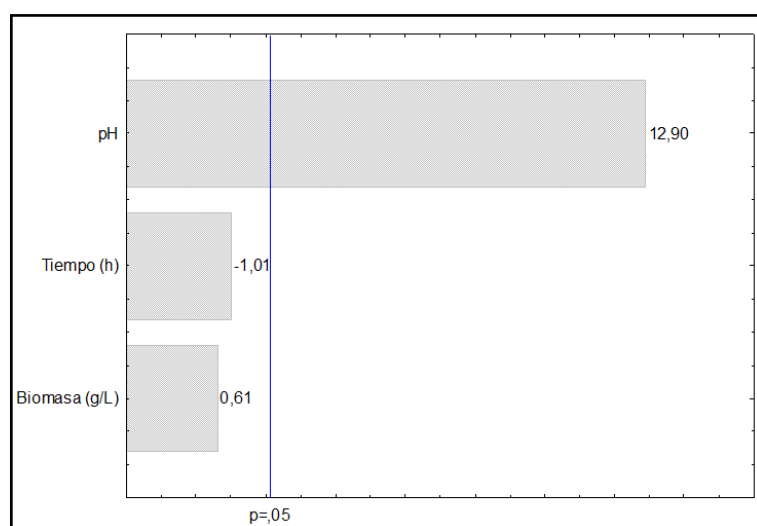


Figura 5.2. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados para la biosorción de cromo (VI) obtenidos en el diseño lineal

A continuación, se estudió la superficie de respuesta del modelo para las variables estudiadas combinadas de dos en dos (*Figuras 5.4, 5.5 y 5.6*).

En la *Figura 5.4* se representa la superficie de respuesta del efecto del pH y la concentración de biomasa sobre el porcentaje de biosorción de cromo (VI). En ella se observa que el punto de mayor biosorción de metal se encuentra a pH 5,5 (nivel = +1) y una concentración de biomasa de 15 g/L (nivel = +1).

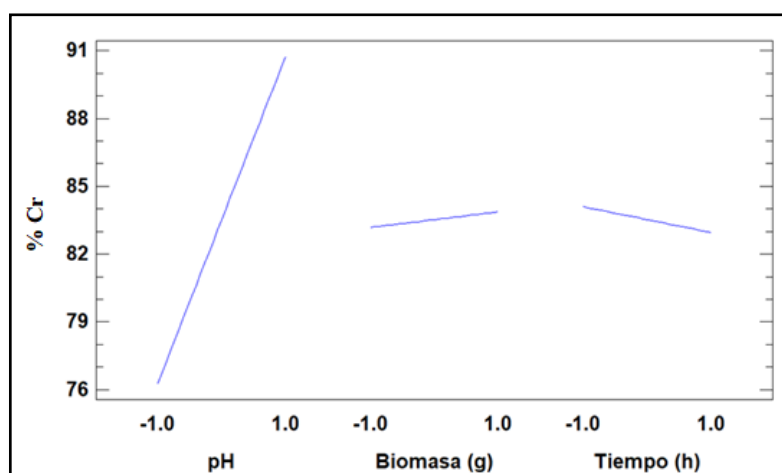


Figura 5.3. Diagrama de los efectos principales del diseño factorial 2^3 para el porcentaje de biosorción de cromo (VI)

En la Figura 5.5 se representa la superficie de respuesta del efecto de la variación del tiempo y la concentración de biomasa sobre el porcentaje de biosorción de cromo (VI). De ella se extrae que el tiempo y la concentración de biomasa con los que se retiene la mayor cantidad de cromo (VI) son 8 h (nivel = -1) y 15 g/L (nivel = +1), respectivamente.

Por último, en la Figura 5.6 se representa la superficie de respuesta del efecto del tiempo y el pH sobre la biosorción de cromo (VI). En este caso las condiciones con un porcentaje mayor de biosorción de cromo (VI) se encuentran a pH 5,5 (nivel = +1) y 8 h (nivel = -1).

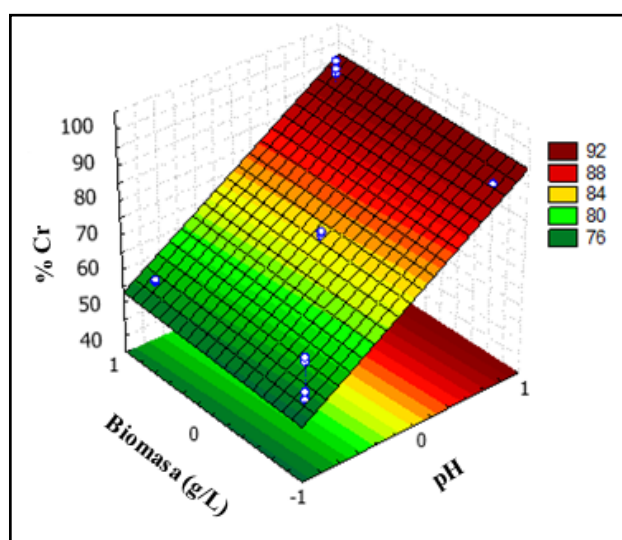


Figura 5.4. Superficie de respuesta del efecto del pH y la concentración de biomasa sobre la biosorción de cromo (VI) (1 mmol/L)

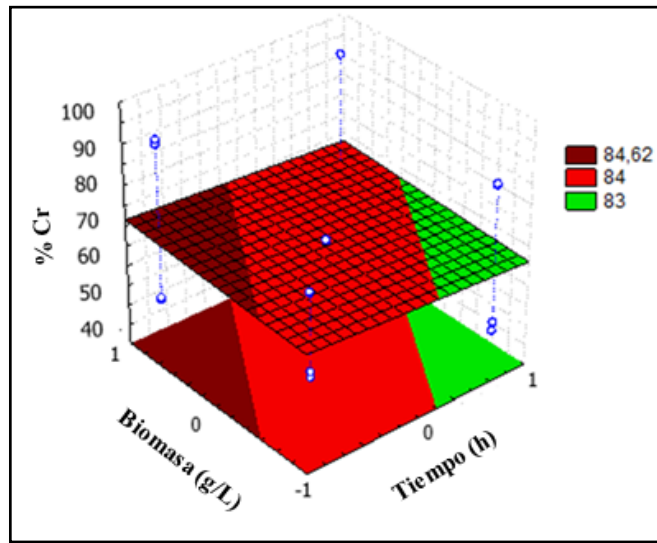


Figura 5.5. Superficie de respuesta del efecto del tiempo y la concentración de biomasa sobre la biosorción de cromo (VI) (1 mmol/L)

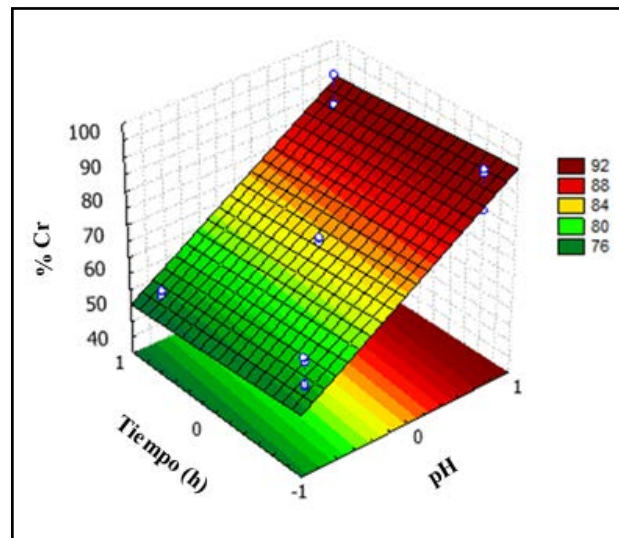


Figura 5.6. Superficie de respuesta del efecto del tiempo y el pH sobre la biosorción de cromo (VI) (1 mmol/L)

A partir de estos resultados, se concluye que los valores óptimos de tiempo de agitación, concentración de biomasa y pH de la disolución a remediar son 8 h, 15 g/L y pH 5,5, respectivamente, condiciones óptimas que serán utilizadas en los siguientes ensayos.

5.2.3. Características analíticas del método de biosorción de Cr(VI)

5.2.3.1. Estudio del rango lineal del método

Uno de los parámetros que se precisan definir cuando se desarrolla un nuevo método es su rango lineal de aplicación. Así, una vez optimizados el pH de la disolución, el tiempo de agitación que dura el ensayo y la concentración de biomasa que se utiliza para remediar la disolución con el metal, se decidió realizar los ensayos descritos en el apartado 5.1.7 variando la concentración inicial de cromo (VI), con el objetivo de establecer el intervalo de linealidad del método. Cada ensayo se realizó por duplicado. En la *Tabla 5.14* se encuentra la media de los porcentajes de biosorción encontrados para cada concentración de metal.

Los parámetros utilizados fueron los siguientes:

- pH: 5,5
- Concentración de biomasa: 15 g/L
- Tiempo de agitación: 8 h
- Concentraciones iniciales de cromo (VI) : 0; 0,25; 0,5; 1 y 2 mmol/L
- Velocidad de agitación: 200 tpm
- Temperatura: 23 °C

Tabla 5.14. Eficacia de la biosorción de Cr(VI) en función de la concentración inicial de metal

Concentración inicial de Cr(VI) (mmol/L)	0	0,25	0,5	1	2
% Cr(VI)	0	90,5	90,1	91,7	91,6

A continuación, se calculó la *capacidad de biosorción* para cada concentración de metal. Dicho parámetro se define como:

$$Q = \frac{V \cdot (C_0 - C)}{W} \quad (21)$$

donde “Q” (mmol/L) es la capacidad de biosorción para un tiempo t, “V” (L) es el volumen de disolución a remediar, “C₀” (mmol/L) es la concentración de metal a un tiempo t=0, “C” (mmol/L) es la concentración de metal para un tiempo t y “W” (g) es la cantidad de biomasa que se utiliza como sorbente. La capacidad de biosorción es un parámetro que se está utilizando recientemente en estudios de biorremediación similares a este trabajo [Azmy y col., 2017; Qu y col., 2018b], y es complementario al valor del rendimiento o eficacia de la biomasa.

Así, se representó la capacidad de biosorción frente a las concentraciones iniciales de cromo (VI) (Figura 5.7) y se obtuvo una tendencia lineal muy satisfactoria en todo el rango de concentración estudiado, con un coeficiente de regresión R^2 de 0,99998.

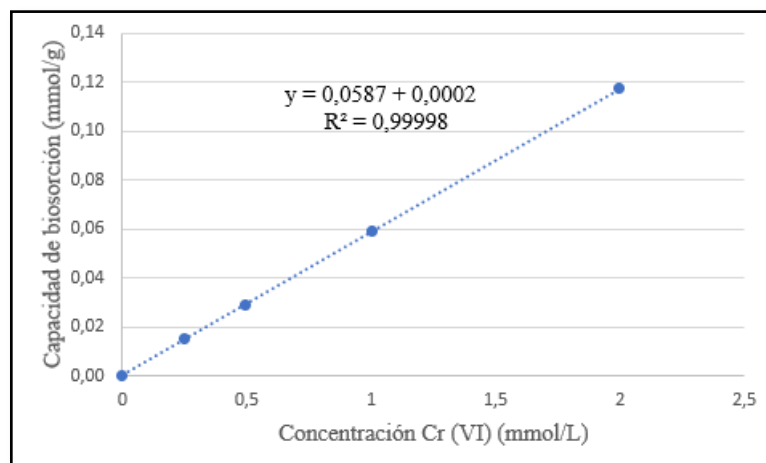


Figura 5.7. Rango lineal de aplicabilidad del método propuesto de biosorción de cromo (VI)

5.2.3.2. Cálculo del límite de detección (LD) y cuantificación (LC)

Según la definición dada por la IUPAC [IUPAC, 1997] del límite de detección y el límite de cuantificación, éstos se calculan según las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{3\sigma}{m} \quad (22)$$

$$LC = \frac{10\sigma}{m} \quad (23)$$

donde “m” es la pendiente de la curva de calibrado y “σ” es la desviación típica de la señal del blanco. El valor de estos límites se estimó para 3 réplicas del blanco que se preparó con biomasa y disolución control B, de la misma manera que se prepara el bote 3 descrito en el apartado 5.1.7, y utilizando los valores de pH, concentración de biomasa y tiempo ya optimizados. La pendiente se obtiene de la recta de calibración de la técnica ICP-OES empleada para las medidas de la disolución de metal, preparada con 8 disoluciones patrón (n=8). Su expresión se incluye a continuación:

$$\text{Señal (IR)} = 0,5259 [\text{Cr(VI) (mg/L)}] + 0,0002 \quad \text{para } n = 8; R^2 = 0,9997$$

A partir de esta ecuación, se obtuvo un límite de detección de 0,06 mg/L de Cr(VI) y un límite de cuantificación de 0,19 mg/L de Cr(VI).

5.2.3.3. Estudio de la reproducibilidad del método

Para estudiar la reproducibilidad del método se analizaron 6 réplicas de los ensayos descritos en el apartado 5.1.7 con las condiciones óptimas y una concentración de cromo (VI) de 1 mmol/L.

A partir de la siguiente ecuación se calculó la precisión del método:

$$\% \text{ error} = \frac{s \cdot t}{\bar{x} \cdot \sqrt{n}} \cdot 100 \quad (24)$$

donde “s” es la desviación estándar de las réplicas, “ \bar{x} ” es la media de las réplicas, “n” es el número de réplicas y “t” es el valor de distribución t tabulado para un intervalo de confianza del 95% y 5 grados de libertad (n-1= 6-1).

La desviación estándar relativa (RSD) se calculó con la siguiente ecuación:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (25)$$

Se obtuvo una media del porcentaje de biosorción de 91,7% con una desviación estándar de 0,56. Con estos datos se obtuvo una precisión del 0,64% y una desviación estándar relativa de 0,61%, para un intervalo de confianza del 95%. Con esto se demuestra que el método presenta una gran reproducibilidad en la biosorción de cromo (VI). En la *Tabla 5.15* se encuentran los datos utilizados para los cálculos, incluyendo la precisión y la desviación estándar relativa.

Tabla 5.15. Reproducibilidad del método en condiciones óptimas

Biosorción de cromo (VI) (%)	91,2; 91,4; 91,2; 91,4; 92,1 92,6
Media (%)	91,7
Desviación estándar (%)	0,56
n	6
Nivel de confianza (%)	95
Grados de libertad	5
t_{tabulada}	2,5706
Precisión (%)	0,64
RSD (%)	0,61

5.2.4. Caracterización de la biomasa de semilla de uva palomino fino

5.2.4.1. Determinación de la densidad aparente de la semilla de uva palomino fino

La densidad que se obtuvo, siguiendo los pasos y cálculos descritos en el apartado 5.1.11.1, para la semilla de uva palomino fino fue $1,02 \pm 0,09$ g/mL. Esta densidad es mayor que las de otras biomazas encontradas en la bibliografía: polvo de cono de pino (0,65 g/mL) [Pholosi y col., 2013]; raíz de la planta gobernadora (*Larrea tridentata*) (0,51 g/mL); hoja de gobernadora (*Larrea tridentata*) (0,50 g/mL); tallo de gobernadora (*Larrea tridentata*) (0,30 g/mL) [Ríos y col., 2014], lo que significa que la semilla de uva palomino fino tiene un menor número de espacios vacíos entre partículas. En la Tabla 5.16 se encuentran todos los datos utilizados para el cálculo.

Tabla 5.16. Determinación de la densidad de la semilla de uva palomino fino

Parámetros	Réplica 1	Réplica 2
Peso del matraz de 10 mL (P0) (g)	12,9462	13,7596
Cantidad de biomasa (P1) (g)	1,0008	1,003
Peso del matraz + cantidad de biomasa (P2) (g)	13,9470	14,7626
Peso del matraz + biomasa, enrasado con agua desionizada (P3) (g)	22,9366	23,9117
Peso del matraz enrasado con agua desionizada (P4) (g)	22,9824	23,8346
Volumen de agua necesario para enrasar el matraz (V1) (mL)	10,06	10,10
Volumen de agua necesario para enrasar el matraz + biomasa (V2) (mL)	9,01	9,17
V _{biomasa} (mL)	1,05	0,93
Densidad (g/mL)	0,95	1,08
Densidad y desviación estándar (g/mL)	1,02 \pm 0,09	

5.2.4.2. Determinación de la capacidad de adsorción de yodo de la semilla de uva palomino fino

La capacidad de adsorción de yodo aporta información sobre la estructura interna del biosorbente [Pholosi y col., 2013]. Una estructura interna más porosa provoca que el biosorbente tenga una mayor relación superficie-masa, y por tanto mayor superficie para interaccionar con el yodo.

Esta capacidad se determinó siguiendo el procedimiento y los cálculos descritos en el apartado 5.1.11.2, obteniéndose un valor de 1182 ± 10 mg I₂/g de biomasa. En la Tabla 5.17 se encuentran todos los datos utilizados para el cálculo.

Los datos obtenidos fueron comparados con los obtenidos en otros estudios para diferentes biomásas. Así, el carbón activado con cloruro de zinc y el carbón activado con fenol, preparados ambos a partir de las algas *Sargassum longifolium* y *Hypnea valentiae* calcinadas a temperaturas entre 400-800 °C, tienen una capacidad de adsorción de yodo de 1041 mg I₂/g de biomasa y 962 mg I₂/g de biomasa, respectivamente, a la temperatura de calcinación más alta [Aravindhan y col., 2009]. Aun habiéndose realizado en dicho trabajo unos tratamientos previos más complejos y costosos, la semilla de uva palomino fino presenta una mayor capacidad de adsorción de yodo. Si se compara con la capacidad de adsorción que presenta el polvo de cono de pino (23,7 mg I₂/g de biomasa) [Pholosi y col., 2013], la semilla de uva palomino fino también presenta una mayor capacidad de adsorción de yodo. Esto indica el gran potencial como adsorbente que tiene la semilla de uva palomino fino.

Tabla 5.17. Determinación de la capacidad de adsorción de yodo de la semilla de uva palomino fino

	Réplica 1	Réplica 2
Cantidad de biomasa (g)	0,011	
Molaridad Na₂S₂O₃ (mol/L)	0,0051	
Volumen de Na₂S₂O₃ gastado en la valoración (L)	0,0115	0,0116
Na₂S₂O₃ gastado (mol)	$5,88 \cdot 10^{-5}$	$5,93 \cdot 10^{-5}$
Moles de I₂ no adsorbidos, en la alícuota de 10 mL	$2,94 \cdot 10^{-5}$	$2,96 \cdot 10^{-5}$
Moles de I₂ no adsorbidos, en los 25 mL	$7,35 \cdot 10^{-5}$	$7,41 \cdot 10^{-5}$
Moles de I₂ adsorbidos por la biomasa	$5,15 \cdot 10^{-5}$	$5,09 \cdot 10^{-5}$
Cantidad de I₂ adsorbido por la biomasa (mg)	13,1	12,9
Capacidad de adsorción (mg I₂/g de biomasa)	1189	1174
Media de la capacidad de adsorción y desviación estándar (mg I₂/g de biomasa)	1182 ± 10	

5.2.4.3. Determinación de la carga superficial negativa de la semilla de uva palomino fino

La carga superficial negativa indica la cantidad de protones intercambiables que hay en la superficie por unidad de biomasa (mmol H⁺/g biomasa) [Pholosi y col., 2013]. Tal y como se indica en la introducción, los procesos de biosorción pueden tener lugar mediante intercambio iónico. Por lo que cuanto mayor sea la carga superficial negativa, mayor cantidad de protones intercambiables tendrá la biomasa en su superficie y será más efectiva para retener cationes metálicos.

Para realizar este estudio se siguió el procedimiento descrito en el *apartado 5.1.11.3*. Debido a la coloración que presentaba el extracto a valorar, en lugar de utilizar un indicador se utilizó el pH-metro (*Ilustración 5.8*) para controlar el cambio de pH y saber en qué momento se alcanza el punto final de la valoración. A partir de este procedimiento se obtuvo una carga superficial negativa de $2,35 \pm 0,24$ mmol H^+ /g de biomasa. En la *Tabla 5.18* se encuentran todos los datos utilizados para el cálculo. Si se compara este resultado con otras biomásas de la bibliografía, se observa que presenta un mayor número de grupos funcionales ácidos que el hueso de aceituna (0,08 mmol/g), el alperujo del olivo (1,25 mmol/g) y el ramón del olivo (0,62 mmol/g) [Calero y col., 2010]. Sin embargo, esta carga superficial negativa en comparación con la del polvo de cono de pino (3,82 mmol/g) [Pholosi y col., 2013] es algo menor, indicando que la semilla de uva palomino fino tiene menos grupos funcionales ácidos en su superficie que el polvo de cono de pino. La comparación de ambas biomásas muestra cómo en el proceso de biosorción con semilla se dará comparativamente mejor el proceso de adsorción mientras que con la biomasa de cono de pino se darán mejor los procesos de intercambio iónico.

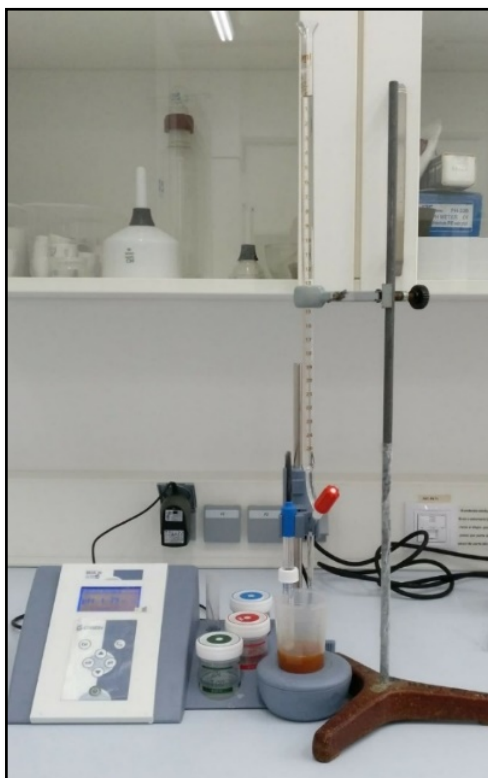


Ilustración 5.8. Montaje del sistema para la valoración del extracto en la determinación de la carga superficial negativa de la semilla de uva palomino fino

Tabla 5.18. Determinación de la carga superficial negativa de la semilla de uva palomino fino

Parámetros	1º Valoración		2º Valoración	
	Extracto 1	Extracto 2	Extracto 1	Extracto 2
Cantidad de biomasa (g)	0,5084		0,5014	
[NaOH] _{factorizada} (mol/L)	0,102			
V _{NaOH gastado} (mL)	8,9	9,6	9,1	9,9
Moles de HCl en la disolución valorada	0,00091	0,00098	0,00093	0,0010
Moles de NaOH en 25 mL que no reaccionan con la biomasa	0,0015	0,0013	0,0014	0,0012
mmol H ⁺	1,06	1,24	1,11	1,32
Carga superficial negativa (mmol H ⁺ /g biomasa)	2,09	2,45	2,23	2,63
Media de la carga superficial negativa y desviación estándar (mmol H ⁺ /g biomasa)	2,35 ± 0,24			

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se obtienen de este trabajo de investigación se resumen a continuación:

- Se ha llevado a cabo un estudio comparativo de la capacidad de biosorción de varias biomásas (la cáscara de naranja amarga verde (*Citrus aurantium*), kumquat (*Citrus japonica*) y semilla de uva palomino fino (*Vitis vinifera* 'Palomino') sobre ciertos metales.
- Se ha observado que la semilla de uva palomino fino es la biomasa más idónea para la biosorción de Pb(II) y Cr(VI), con porcentajes en torno al 90%. Mientras que para la biosorción de Ni(II), Cd(II) y Co(II) la biomasa más efectiva es la cáscara de naranja amarga verde, con porcentajes en el rango 26-43%.
- Se ha observado que el proceso de biosorción de metal depende del pH, de forma que en el caso de la semilla de uva palomino fino existe un aumento de la capacidad de biosorción al pasar de pH 3 a pH 4,8; mientras que en el caso de la cáscara de naranja amarga verde y del kumquat se observa una disminución de la capacidad de biosorción al aumentar el pH.
- Se ha desarrollado un método eficaz de biorremediación para eliminar el cromo de aguas contaminadas, que consiste en utilizar una biomasa de fácil adquisición, la semilla de uva palomino fino, que es capaz de retener cromo (VI) presente en el agua, con un porcentaje medio de biosorción del 91,7%.
- La optimización del método se ha llevado a cabo utilizando un diseño de experimento 2^3 y las condiciones óptimas encontradas han sido las siguientes: pH 5,5, concentración de biomasa 15 g/L y tiempo de agitación 8 h.
- Se han estudiado las características de dicho método: rango lineal de aplicación, límite de detección (LD) y cuantificación (LC) y reproducibilidad. De estos estudios se concluye que el método es aplicable en un rango de concentración de cromo (VI) de 0 a 2 mmol/L, con un LD de 0,06 mg/L y un LC de 0,19 mg/L y una precisión muy satisfactoria de 0,64%.
- Se ha realizado la caracterización de la semilla de uva palomino fino, encontrándose que tiene una densidad de 1,02 g/mL, una capacidad de adsorción de yodo bastante elevada, de 1181,5 mg/g biomasa y una carga superficial negativa de 2,35 mmol H^+ /g biomasa. Estos resultados demuestran la utilidad que tiene esta biomasa como sorbente en su aplicación en el tratamiento de aguas contaminadas por metales.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. EE.UU. Resumen de Salud Pública de Cadmio. División de Toxicología y Medicina Ambiental. Atlanta, GA, ATSDR, 1999.

Ali, A. (2017). Environmental Nanotechnology, Monitoring y Management Removal of Mn (II) from water using chemically modified banana peels as efficient adsorbent. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 7, 57–63.

Ali, A., Saeed, K., y Mabood, F. (2015). Removal of chromium (VI) from aqueous medium using chemically modified banana peels as efficient low-cost adsorbent. *Alexandria Engineering Journal*, 55, 2933–2942.

Alvarado, S., Guédez, M., Lué-Merú, M. P., Nelson, G., Alvaro, A., Jesús, A. C., y Gyula, Z. (2008). Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). *Bioresource Technology*, 99(17), 8436–8440.

Aravindhnan, R., Raghava Rao, J., y Unni Nair, B. (2009). Preparation and characterization of activated carbon from marine macro-algal biomass. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2–3), 688–694.

Azmy, H. A. M. A., Razuki, N. A., Aziz, A. W., Satar, N. S. A., y Kaus, N. H. M. (2017). Visible light photocatalytic activity of BiFeO₃ nanoparticles for degradation of methylene blue. *Journal of Physical Science*, 28(2), 85–103.

Baken, K. A., Sjerps, R. M. A., Schriks, M., y van Wezel, A. P. (2018). Toxicological risk assessment and prioritization of drinking water relevant contaminants of emerging concern. *Environment International*, 118(June), 293–303.

Basu, M., Guha, A. K., y Ray, L. (2017). Adsorption of Lead on Cucumber Peel. *Journal of Cleaner Production*, 151, 603–615.

Benson, R., Conerly, O. D., Sander, W., Batt, A. L., Boone, J. S., Furlong, E. T., Glassmeyer, S. T., Kolpin, Mash, H. E., Schenck, K. M. y Ellen, J. (2017). Human health screening and public health significance of contaminants of emerging concern detected in public water supplies. *Science of the Total Environment*, 579, 1643–1648.

Calero, M., Hernáinz, F., Blázquez, G., Martín-Lara, M. A., y Tenorio, G. (2010). Efecto de diferentes tratamientos químicos en las características sorbentes de residuos derivados de la industria olivarera. *Afinidad*, 67(548).

Chen, J., He, J. (2014). A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: Materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools. *Bioresource Technology*, 160, 67–78.

- Cid, H. A., Flores, M. I., Pizarro, J. F., Castillo, X. A., Barros, D. E., Moreno-Piraján, J. C., y Ortiz, C. A. (2018). Mechanisms of Cu²⁺ biosorption on *Lessonia nigrescens* dead biomass: Functional groups interactions and morphological characterization. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 2696–2704.
- Edelstein, M., y Ben-Hur, M. (2018). Heavy metals and metalloids: Sources, risks and strategies to reduce their accumulation in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 234, 431–444.
- Elhosary, N., Maklad, A., Soliman, E., El-Ashmawy, N., y Oreby, M. (2014). Evaluation of oxidative stress and DNA damage in cement and tannery workers in Egypt. *Inhalation Toxicology*, 26(5), 289–298.
- Eroglu, H., Varoglu, E., Yapici, S., y Sahin, A. (2010). An environmentally friendly batch bioadsorption study of the radionuclides ⁶⁷Ga from aqueous solutions by fibrous tea waste. *Chemical Engineering Journal*, 165(2), 563–572.
- Fomina, M., y Gadd, G. M. (2014). Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource Technology*, 160, 3–14.
- Fourest, E., Canal, C., Roux, J.-C., 1994. Improvement of heavy metal biosorption by mycelial dead biomasses (*Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei* and *Penicillium chrysogenum*): pH control and cationic activation. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 325–332.
- González-Rojas, E. H. (2011). Concepto y estrategias de biorremediación. *INGE@ UAN-Tendencias en la Ingeniería*, 1(2).
- Jarvis, P., Quay, K., Macadam, J., Edwards, M., y Smith, M. (2018). Intake of lead (Pb) from tap water of homes with leaded and low lead plumbing systems. *Science of the Total Environment* 644, 1346–1356.
- Kapnisti, M., Noli, F., Misaelides, P., Vourlias, G., Karfaridis, D., & Hatzidimitriou, A. (2018). Enhanced sorption capacities for lead and uranium using titanium phosphates; sorption, kinetics, equilibrium studies and mechanism implication. *Chemical Engineering Journal*, 342(February), 184–195.
- Kaya, A., Onac, C., Alpoguz, H. K., Yilmaz, A. y Atar, N. (2016). Removal of Cr(VI) through calixarene based polymer inclusion membrane from chrome plating bath water. *Chemical Engineering Journal*, 283, 141–149.
- Kobielska, P. A., Howarth, A. J., Farha, O. K., y Nayak, S. (2018). Metal–organic frameworks for heavy metal removal from water. *Coordination Chemistry Reviews*, 358, 92–107.

Landrigan, P. J., Fuller, R., Acosta, N. J. R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N., ... Zhong, M. (2017). The Lancet Commission on pollution and health. *The Lancet*, 391.

Lasheen, M. R., Ammar, N. S., y Ibrahim, H. S. (2012). Adsorption/desorption of Cd(II), Cu(II) and Pb(II) using chemically modified orange peel: Equilibrium and kinetic studies. *Solid State Sciences*, 14(2), 202–210.

Ley Orgánica 5/2002, de 3 de junio, sobre vertidos de aguas residuales industriales a los sistemas públicos de saneamiento, núm. 170, de 17 de julio de 2002, pp. 26180 a 26187.

Lipko, M., y Debski, B. (2018). Mechanism of insulin-like effect of chromium(III) ions on glucose uptake in C2C12 mouse myotubes involves ROS formation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 45(August 2017), 171–175.

Mahindrakar, K. V., y Rathod, V. K. (2018). Utilization of banana peels for removal of strontium (II) from water. *Environmental Technology and Innovation*, 11, 371–383.

Manawi, Y., McKay, G., Ismail, N., Kayvani Fard, A., Kochkodan, V., y Atieh, M. A. (2018). Enhancing lead removal from water by complex-assisted filtration with acacia gum. *Chemical Engineering Journal*, 352(May), 828–836.

Mohammed, K., y Sahu, O. (2015). Bioadsorption and membrane technology for reduction and recovery of chromium from tannery industry wastewater. *Environmental Technology and Innovation*, 4, 150–158.

Morosanu, I., Teodosiu, C., Paduraru, C., Ibanescu, D., y Tofan, L. (2017). Biosorption of lead ions from aqueous effluents by rapeseed biomass. *New Biotechnology*, 39, 110–124.

Ofomaja, A. E., y Naidoo, E. B. (2010). Biosorption of lead(II) onto pine cone powder: Studies on biosorption performance and process design to minimize biosorbent mass. *Carbohydrate Polymers*, 82(4), 1031–1042.

Ordoñez Romero, A. E., (2015). Bioadsorción de Pb y Cr mediante la utilización de Cáscara de Naranja (*Citrus sinensis*) molida, Machala 2014. Trabajo de Grado. Universidad Técnica de Machala. Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud.

Pholosi, A., Ofomaja, A. E., y Naidoo, E. B. (2013). Effect of chemical extractants on the biosorptive properties of pine cone powder: Influence on lead(II) removal mechanism. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17(1), 77–86.

Qu, L., Huang, H., Xia, F., Liu, Y., Dahlgren, R. A., Zhang, M., y Mei, K. (2018a). Risk analysis of heavy metal concentration in surface waters across the rural-urban interface of the Wen-Rui Tang River, China. *Environmental Pollution*, 237, 639–649.

- Qu, R., Sun, C., Ma, F., Zhang, Y., Ji, C., y Yin, P. (2018b). Removal of Fe(III) from ethanol solution by silica-gel supported dendrimer-like polyamidoamine polymers. *Fuel*, 219(January), 205–213.
- Ríos, M. D., Muñoz, K. G., Tabizón, E. F., Márquez, D., Avitia, A. Y. C., Contreras, L. E. E. S., y González, J. R. (2016). Caracterización y capacidad de adsorción de la especie vegetal *Larrea tridentata* como adsorbente de color. *CULCyT*, (54).
- Sarwar, N., Imran, M., Rashid, M., Ishaque, W., Asif, M., Matloob, A., Rehim, A. y Hussain, S. (2017). Chemosphere Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals : Modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171, 710–721.
- Satarug, S., Vesey, D. A., y Gobe, G. C. (2017). Current health risk assessment practice for dietary cadmium: Data from different countries. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 430–445.
- Schneider, I. A. H., Rubio, J., & Smith, R. W. (2001). Biosorption of metals onto plant biomass: Exchange adsorption or surface precipitation? *International Journal of Mineral Processing*, 62(1–4), 111–120.
- Suh, M., Thompson, C. M., Brorby, G. P., Mittal, L., y Proctor, D. M. (2016). Inhalation cancer risk assessment of cobalt metal. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 79, 74–82.
- Tao, H. C., Zhang, H. R., Li, J. B., y Ding, W. Y. (2015). Biomass based activated carbon obtained from sludge and sugarcane bagasse for removing lead ion from wastewater. *Bioresource Technology*, 192, 611–617.
- Taseidifar, M., Makavipour, F., Pashley, R. M., y Rahman, A. F. M. M. (2017). Removal of heavy metal ions from water using ion flotation. *Environmental Technology and Innovation*, 8, 182–190.
- Tejada-Tovar, C., Villabona-Ortiz, Á., y Garcés-Jaraba, L. (2015). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecno Lógicas*, 18(34), 109–123.
- Volesky, B. (2001). Detoxification of metal-bearing effluents: Biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*, 59(2–3), 203–216.
- World Health Organization, (2010). Childhood lead poisoning. Geneva, Switzerland, pp. 74.
- Zambelli, B., Uversky, V. N., y Ciurli, S. (2016). Nickel impact on human health : An intrinsic disorder perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1864(12), 1714–1731.
- Zhang, L., Zhao, B., Xu, G., y Guan, Y. (2018). Characterizing fluvial heavy metal pollutions under different rainfall conditions: Implication for aquatic environment protection. *Science of the Total Environment*, 635, 1495–1506.